

**Nanopartikel auf Oberflächen –  
Charakterisierung und Anwendung in der  
oberflächenverstärkten Raman-Streuung**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Dipl. Chem. Virginia Joseph

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter/innen:

1. Prof. Janina Kneipp
2. Prof. Klaus Rademann
3. Prof. Ulrich Panne

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2012



## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden nanostrukturierte Oberflächen durch Immobilisierung von Gold- und Silbernanopartikeln mit Organosilanen hergestellt und bezüglich ihrer Eigenschaften als Substrate für die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (*Surface-enhanced Raman scattering*, SERS) untersucht. In Experimenten zum Einfluss von Partikelgröße und -anordnung auf die plasmonischen Eigenschaften wurden wesentliche Erkenntnisse für die Optimierung SERS-aktiver Nanostrukturen gewonnen. Insbesondere wurde die Größenabhängigkeit des elektromagnetischen Beitrags zur SERS-Verstärkung von Goldnanopartikeln erstmalig experimentell bestimmt. Durch Kombination experimenteller Untersuchungen, unter Verwendung von spektroskopischen und bildgebenden Verfahren, mit elektrodynamischen Simulationen der lokalen Felder, wurden Zusammenhänge zwischen den plasmonischen und nanoskopischen Eigenschaften von Partikeln auf Oberflächen und ihren SERS-Eigenschaften hergestellt.

Die nanostrukturierten Oberflächen weisen hohe und über einen weiten Analytkonzentrationsbereich stabile Verstärkungsfaktoren bei hoher mikroskopischer Homogenität der Verstärkung auf. Dies unterscheidet sie von Nanopartikeln in Lösung, bei denen eine Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Analytkonzentration beobachtet wurde, und macht sie zu geeigneten Substraten für quantitative Anwendungen von SERS. Aufgrund der hohen Stabilität der organosilan-immobilisierten Nanopartikel ist eine gezielte Funktionalisierung der Oberflächen möglich. Das Potenzial der nanostrukturierten Oberflächen für den Einsatz in analytischen Fragestellungen wurde anhand mehrerer Anwendungen gezeigt. Signalschwankungen, die bei der Detektion komplexer Analytgemische auftreten können, werden durch die Immobilisierung der Nanostrukturen deutlich reduziert. Damit wird die Anwendung multivariater Analysemethoden für eine automatisierte Klassifizierung und Identifizierung in Molekülgemischen, aber auch Multiplexing und Bildgebung, anhand von SERS-Spektren ermöglicht.

Durch simultane Immobilisierung von Gold- mit Silbernanopartikeln und Gold- mit Platinnanopartikeln unter Verwendung desselben Linkermoleküls wurden erstmalig Oberflächen mit definierten plasmonischen und funktionellen Eigenschaften schnell, kostengünstig und reproduzierbar erzeugt. Diese neuartigen Mischsubstrate wurden in der Verfolgung katalytischer Reaktionen eingesetzt. Damit konnten zum ersten Mal die Reaktionskonstanten solcher Reaktionen mittels SERS bestimmt werden.

Die Ergebnisse der Arbeit legen einen breiten Einsatz der plasmonischen nanostrukturierten Oberflächen in der Zukunft nahe. Dieser reicht von Untersuchungen in der Katalyseforschung über mikroskopische Anwendungen von SERS bis zur Verwendung in der klinischen Diagnostik.

## Abstract

Within this work nanostructured surfaces were generated by immobilization of gold and silver nanoparticles with organosilanes and characterized regarding to their suitability as substrates for Surface-enhanced Raman scattering (SERS). Essential knowledge for the optimization of SERS-active nanostructures could be found by experimental investigations on the influence of particle size and assembly on the plasmonic properties. In particular, the effect of the size of the gold nanoparticles on the electromagnetic contribution to the SERS enhancement could be investigated experimentally for the first time. Through combined experimental investigations, including spectroscopic and imaging techniques, and electrodynamic simulations of local fields, the plasmonic and nanoscopic properties of particles on surfaces were related to their SERS-properties.

The nanostructured surfaces exhibit high and, over a wide range of analyte concentration, stable enhancement factors with high microscopic homogeneity. This is in contrast to nanoparticles in solution where a dependence of the enhancement factor on the analyte concentration was observed. Therefore immobilized nanostructures are suitable substrates for quantitative SERS. Due to the high stability the organosilane immobilized nanoparticles can be specifically functionalized. The potential for the use of the nanostructured surfaces in analytical problems was shown in various applications. Signal fluctuations that can occur in the detection of complex analyte mixtures can be significantly reduced by immobilization of the nanoparticles. This offers the possibility to use multivariate statistical methods for automated classification and identification of molecule mixtures but also for multiplexing and imaging by SERS.

Simultaneous immobilization of gold and silver nanoparticles and gold and platinum nanoparticles using the same linker molecule allowed for the first time to generate surfaces with defined plasmonic and functional properties with low cost and high reproducibility. These new *mix and match*-substrates were used to follow catalytic reactions and determine reaction constants of such reactions for the first time using SERS.

The outcome of this work suggests a wide range of applications of plasmonic nanostructured surfaces in the future. This includes the investigation of catalysis, microscopic applications of SERS and clinical diagnosis.



## **Danksagung**

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Ulrich Panne für die Möglichkeit danken, den Großteil meiner Promotion an der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung absolvieren zu können. Ich habe dort ein interessantes Arbeitsumfeld vorgefunden, was mir ein strukturiertes und innovatives Arbeiten ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau Prof. Janina Kneipp, die mir immer viel Freiraum zur Entwicklung und Umsetzung eigener Ideen gewährt hat und dennoch stets, trotz zwischenzeitlicher Elternzeit, mit hilfreichen Diskussionen und konstruktivem Rat zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich all meinen Kooperationspartnern danken, ohne die, viele in dieser Arbeit gewonnene, Erkenntnisse nicht möglich gewesen wären: Manuel Gensler für die zahlreichen SFM-Aufnahmen und die Diskussion der Ergebnisse, Franziska Emmerling, Simone Rolf und Andrea Matschulat für die gute Zusammenarbeit bei der „Goldbar“, Stephan Seifert für die Unterstützung bei der Untersuchung der Pollen, Kristján Leósson für die fruchtbare Kooperation, Christian Engelbrekt und Jens Ulstrup für die Durchführung der STM-Messungen und die Zurverfügungstellung der Platinnanopartikel, sowie Jonas Schenk für die Herstellung der laserablatierten Silbernanopartikel.

Die vielen produktiven Gespräche mit meinem Freund Sven Merk haben mir oft geholfen, den Blickwinkel auf Problemstellungen in meiner Arbeit zu verändern. Vor allem jedoch gebührt ihm mein Dank für seine moralische Unterstützung und seine unendliche Geduld.

Ebenso soll hier dankend die jederzeitige Unterstützung meiner gesamten Arbeitsgruppe und der freundschaftliche Umgang in der Gruppe Erwähnung finden. Bei meinen Bürokollegen Charlotte Giesen, Andrea Matschulat, Jonas Schenk und Arne Stindt möchte ich mich für die stets freundschaftliche und offene Atmosphäre und die vielen Dialoge, die zur Lösung manch eines Problems beigetragen haben, bedanken.

Ich bin und war Anka Kohl dankbar für die Erhaltung meiner Arbeitsfähigkeit, indem sie meinen Computer stets am Laufen hielt und bei IT-Problemen zur Stelle war. Selbstverständlich danke ich auch den vielen, hier nicht namentlich erwähnten, Kolleginnen und Kollegen für die gute und kollegiale Zusammenarbeit während meiner Promotionszeit.

Last but not least geht mein Dank auch an meine Familie und meine Freunde, die mir während dieser aufregenden Zeit mit vielen Hochs und Tiefs viel Kraft gegeben haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Motivation und Zielstellung .....</b>	<b>11</b>
<b>2. SERS – Raman-Streuung im lokalen Feld .....</b>	<b>15</b>
2.1 Raman-Streuung .....	16
2.2 Ursache der Verstärkung im SERS .....	19
2.3 Abhängigkeit der SERS-Verstärkung von den plasmonischen Eigenschaften der Nanostrukturen .....	22
2.4 Bestimmung von Verstärkungsfaktoren .....	23
2.5 Charakterisierung von Metallnanostrukturen .....	24
2.6 Finite Differenzen-Methode (FDTD) zur Simulation der Lichtstreuung und des elektrischen Feldes an Nanostrukturen .....	31
<b>3. Materialien und Methoden .....</b>	<b>34</b>
3.1 Herstellung von Gold-, Silber- und Platinnanopartikeln in Lösung .....	34
3.2 Immobilisierung der Metallnanopartikel auf Glasoberflächen .....	36
3.3 Herstellung von Oberflächen mit Nanopartikelmischungen .....	36
3.4 Herstellung von SERS-Substraten mittels Elektronenstrahlolithographie .....	37
3.5 Charakterisierung der plasmonischen und morphologischen Eigenschaften der Nanopartikel in Lösung und auf Oberflächen .....	38
3.6 Raman-Experimente .....	40
3.7 Bestimmung der SERS-Verstärkungsfaktoren .....	41
3.8 Probenpräparation und Vorgehensweise in den Experimenten zur Bestimmung der SERS-Verstärkungsfaktoren .....	42
3.9 FDTD-Berechnungen der Intensität des lokalen Feldes von plasmonischen Nanostrukturen .....	43

3.10	Bestimmung der Reaktionskonstanten verschiedener Katalysatoren .....	44
3.11	SERS-Experimente mit Norepinephrin.....	46
3.12	SERS-Experimente mit wässrigen Extrakten von Pollen .....	47
3.13	Bestimmung der Thiopurin-S-Methyltransferaseaktivität .....	47
<b>4.</b>	<b>Gold und Silbernanopartikel als SERS-Substrate.....</b>	<b>49</b>
4.1	Plasmonische und morphologische Eigenschaften unterschiedlich hergestellter Gold- und Silbernanopartikel.....	50
4.2	Verstärkungsfaktoren der Nanopartikel in Lösung .....	53
4.3	Untersuchung der Größenabhängigkeit der SERS-Verstärkung von Goldnanopartikeln in Lösung.....	55
<b>5.</b>	<b>Nanoskopische Eigenschaften gemischter SERS-Substrate in mikroskopischen Anwendungen von SERS .....</b>	<b>66</b>
5.1	Plasmonische und nanoskopische Eigenschaften immobilisierter Nanopartikelsubstrate.....	66
5.2	Verstärkungsfaktoren und mikroskopische Homogenität des Verstärkungsfaktors immobilisierter Nanopartikelsubstrate .....	75
5.3	Untersuchung der Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Analytkonzentration für immobilisierte, monodisperse Goldnanopartikel.....	79
5.4	Herstellung und Charakterisierung von Misch-Substraten mit unterschiedlichen Gold- und Silbernanopartikeln.....	81
<b>6.</b>	<b>Elektronenstrahlolithographisch hergestellte Goldnanopartikeloberflächen als SERS-Substrate und Vergleich mit immobilisierten Nanopartikeln .....</b>	<b>88</b>
<b>7.</b>	<b>Kombination katalytischer und plasmonischer Nanopartikel auf Oberflächen für in situ-Untersuchungen kinetischer Reaktionen mittels SERS .....</b>	<b>98</b>
7.1	Organosilan-immobilisierte Nanopartikel und Nanopartikelmischungen als SERS-Substrate für die Untersuchung katalytischer Reaktionen .....	99

7.2	Wahl eines geeigneten internen Standards .....	103
7.3	Bestimmung der katalytischen Aktivität verschiedener Katalysatoren.....	106
<b>8.</b>	<b>Analytische Anwendungen der SERS-Substrate.....</b>	<b>113</b>
8.1	Klassifizierung von Pollen anhand von SERS-Spektren ihrer wasserlöslichen Bestandteile .....	113
8.2	Anwendung funktionalisierter Substrate für die Messung von Neurotransmittern .....	121
8.3	Relative Quantifizierung von 6-Methylmercaptapurin für die Bestimmung der Thiopurin-S-Methyltransferaseaktivität .....	127
<b>9.</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick.....</b>	<b>133</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>138</b>
10.1	Abkürzungsverzeichnis .....	138
10.2	Publikationsverzeichnis.....	141
10.3	Selbständigkeitserklärung .....	144



## 1. Motivation und Zielstellung

Aufgrund ihrer besonderen optischen und elektronischen Eigenschaften finden Metallnanostrukturen in vielen Bereichen wie Optik, Photonik, Bildgebung<sup>[1,2]</sup>, aber auch in der Katalyse<sup>[3,4]</sup> und der Datenspeicherung Anwendung. Die optischen Eigenschaften von Gold- und Silbernanopartikeln zeichnen sich durch eine intensive Lichtabsorption im sichtbaren Spektralbereich aus, die auf kollektiven Schwingungen der Leitungsbandelektronen bei Wechselwirkung mit einem elektromagnetischen Feld beruhen. Diese kollektiven Schwingungen werden als Plasmonen bezeichnet.

Die Anregung der Plasmonen führt zu einer Resonanzverstärkung des elektromagnetischen Feldes in der Nähe der Nanostrukturen, wodurch sehr hohe lokale Felder entstehen können<sup>[5,6,7]</sup>. Der wohl beeindruckendste Effekt, der sich aus diesen hohen lokalen Feldern ergibt, ist die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (*Surface-enhanced Raman scattering*, SERS)<sup>[8,9]</sup>. In SERS-Experimenten können Verstärkungen von Raman-Signalen der Moleküle, die sich in der Nähe von Metallnanostrukturen befinden, um bis zu 14 Größenordnungen beobachtet werden<sup>[10]</sup>. SERS ermöglicht eine nicht-invasive Gewinnung molekülspezifischer Informationen mit einer hohen Empfindlichkeit und eine schnelle und empfindliche Detektion von Analytmolekülen und komplexen Analytgemischen, wie sie z.B. in biologischen Systemen auftreten<sup>[11,12,13]</sup>. Die Anwendung von SERS in bioanalytischen und medizinischen Fragestellungen hat daher in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen<sup>[11,12,13,14,15]</sup>.

Die Verstärkung der Raman-Signale hängt von den plasmonischen und morphologischen Eigenschaften der Partikel, wie Größe, Form und Polydispersität, sowie deren Aggregationsverhalten ab<sup>[16,17,18,19]</sup>. Eine Voraussetzung für die Nutzung von SERS in der Analytik ist die Verwendung stabiler, reproduzierbarer und gut charakterisierter Nanostrukturen, die einfach herzustellen sind, sodass sie bei Bedarf direkt im analytischen Labor erzeugt werden können.

Aufgrund ihrer günstigen physikochemischen Eigenschaften werden überwiegend Gold- und Silbernanostrukturen als sogenannte SERS-Substrate verwendet<sup>[8,20,21,22]</sup>. Häufig befinden sich die Nanostrukturen in Lösung oder sind Bestandteil nanostrukturierter Oberflächen<sup>[20,23]</sup>.

Bei den Nanostrukturen in Lösung handelt es sich meist um sphärische Gold- und Silbernanopartikel im Größenbereich von 10-100 nm<sup>[6,24]</sup>. In den letzten Jahren wurden zunehmend gezielt andere Formen, wie Stäbchen, Würfel oder Dreiecke hergestellt und als SERS-Substrate getestet<sup>[25,26,27]</sup>. Nanopartikel in Lösung bieten die Vorteile einer einfachen, kostengünstigen und reproduzierbaren Synthese. Sie weisen gute SERS-Verstärkungen auf und können leicht in biologische Systeme, wie z.B. Zellen<sup>[28,29,30]</sup>, eingebracht werden. Der Nachteil von Nanopartikeln in Lösung ist ihre Instabilität gegenüber der Zugabe von Analytmolekülen. Die Stabilisierung der Nanopartikel erfolgt in der Regel über eine elektrische Doppelschicht an der Nanopartikeloberfläche, die zu einer Abstoßung der Partikel führt<sup>[31,32]</sup>. Bei Zugabe eines Analytmoleküls wird die elektrische Doppelschicht verändert und es kann zu einer Aggregation der Nanopartikel<sup>[19,33]</sup> kommen. In den Aggregaten treten sehr hohe lokale Felder auf<sup>[10,34]</sup>, deren Intensität von der Größe und Form der Aggregate abhängt<sup>[35,36]</sup>. Durch Brownsche Molekularbewegung der Partikel im Fokusvolumen während des Raman-Experiments kommt es zu Signalfuktuationen bzw. auf Oberflächen zu einer inhomogenen Verteilung der Verstärkung. Die Aggregation der Nanopartikel kann auch zu deren Sedimentation führen, sodass die Partikel dann als solche nicht mehr im Experiment zur Verfügung stehen<sup>[37]</sup>. Quantitative Messungen ohne Anwendung eines internen Standards sind aufgrund der starken Signalveränderungen nicht möglich.

Im Gegensatz dazu zeigen flächige SERS-Substrate, d.h. nanostrukturierte Oberflächen dieses Problem nicht. Desweiteren können die meisten flächigen Substrate leicht funktionalisiert werden, was die Untersuchung von Reaktionsverläufen und eine selektive Anbindung von Analytmolekülen ermöglicht<sup>[38,39,40]</sup>. Die ersten flächigen SERS-Substrate waren aufgeraute Elektrodenoberflächen<sup>[41]</sup> und Inselfilme<sup>[42]</sup>. Diese zeigen jedoch eine schlechte Reproduzierbarkeit bezogen auf ihre Herstellung. Eine Methode, bei der sowohl die Größe als auch die Form der Partikel mit hoher Reproduzierbarkeit eingestellt werden kann, ist die Nanolithographie<sup>[43,44]</sup>. Allerdings sind nanolithographische Verfahren sehr aufwändig und kostenintensiv. Eine weitere Möglichkeit zur Anordnung von Nanopartikeln ist ihre Einbettung in eine Matrix, z.B. in ein Sol-Gel<sup>[45]</sup>, Glas<sup>[46]</sup> oder in ein Polymer<sup>[47]</sup>. Bei diesen Substraten besteht jedoch das Problem, dass die Nanopartikel nicht einfach nachträglich funktionalisiert werden können und ihre Stabilität sehr begrenzt sein kann<sup>[48]</sup>.



Ein vielversprechender Ansatz für die Herstellung nanostrukturierter, plasmonischer Oberflächen ist die Anordnung von Nanopartikeln auf Glasoberflächen mittels Organosilanen<sup>[49,50]</sup> (schematische Abbildung 1-1). Dabei werden die Vorteile von Nanostrukturen in Lösung, wie ihre einfache und reproduzierbare Herstellbarkeit, mit der Stabilität flächiger Substrate vereint.

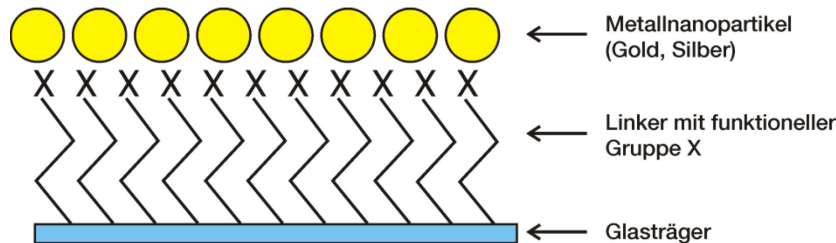


Abbildung 1-1: Vereinfachte schematische Darstellung der Immobilisierung von Nanopartikeln auf einer Glasoberfläche mittels eines Organosilans.

Die Eigenschaften so hergestellter Oberflächen in SERS-Experimenten wurde in den vergangenen 20 Jahren vielfach an Modellsystemen, wie z.B. Porphyrinen und verschiedenen Farbstoffen gezeigt<sup>[51,52,53,54,55,56]</sup>. Bis auf diese spezifischen Beispiele wurden jedoch keine systematischen Untersuchungen durchgeführt, die die Eigenschaften im SERS-Experiment mit den nanoskopischen Eigenschaften der Strukturen auf den Oberflächen in Verbindung bringen. Eine solche Korrelation ist der letzte wichtige Schritt zum Einsatz solcher Oberflächen in analytischen Fragestellungen und in der Spektroskopie.

Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis der Zusammenhänge der Eigenschaften organosilan-basierter, nanostrukturierter Oberflächen und ihren Eigenschaften im SERS-Experiment zu erlangen. Diese Erkenntnisse sind Voraussetzung dafür, dass solche Oberflächen reproduzierbar und gezielt hergestellt und für neue Anwendungen optimiert werden können. Dazu behandelt die Arbeit die folgenden spezifischen Aspekte:

- 1) Plasmonische und nanoskopische Eigenschaften der Oberflächen im Zusammenhang mit wichtigen Parametern bezogen auf SERS

Diese Fragestellung beinhaltet Untersuchungen zum Verstärkungsfaktor unter verschiedenen Bedingungen und zu den optischen Eigenschaften immobilisierter und nicht-immobilisierter Nanopartikel, insbesondere die Verbindung von SERS-Daten mit Informationen aus nanoskopischen Bildgebungsverfahren.

So können im SERS-Experiment Verstärkungen von  $10^3$ , wie sie für Einzelpartikel theoretisch vorhergesagt werden<sup>[5,57]</sup>, bis zu  $10^{14}$  in hohen lokalen Feldern zwischen Nanopartikeln in Nanopartikelaggregaten<sup>[58]</sup> variieren. Außerdem stellt sich die Frage nach der *Homogenität der Verstärkung* auf mikroskopischer und nanoskopischer Ebene. Für analytische Anwendungen ist eine homogene Verteilung der Verstärkung erforderlich, da nur dann eine großflächige und gleichmäßige Detektion und quantitative Anwendungen möglich sind. Voraussetzung für eine Quantifizierung und die Anwendung multivariater Methoden, für die Identifizierung komplexer Proben und Analytmischungen mit SERS und für die Bildgebung, ist die *Stabilität der Verstärkung über einen großen Analytkonzentrationsbereich*.

### 2) Simultane Immobilisierung verschiedener Nanopartikel zur Herstellung von Oberflächen mit neuen Eigenschaften

Im Vergleich zu nanolithographischen Verfahren ist der Ansatz in dieser Arbeit sehr einfach. Nanopartikel werden mit einem Organosilanlinker auf einer Oberfläche immobilisiert. Diese Herstellungsweise sollte ebenso eine *simultane Immobilisierung verschiedenartiger Nanostrukturen* auf einfache Weise ermöglichen. Dabei können prinzipiell neue plasmonische Eigenschaften und neue Funktionalitäten, wie z.B. eine veränderte Wechselwirkung mit dem Analytmolekül<sup>[59]</sup> entstehen. Insbesondere diskutiert diese Arbeit solche neuen Oberflächen für die Untersuchung katalytischer Prozesse anhand der Kinetik von Modellreaktionen.

### 3) Gezielte Funktionalisierung der Oberflächen und Anwendung in der Analytik

Im letzten Schritt wird anhand unterschiedlicher Anwendungen das Potenzial der Substrate für die Analytik gezeigt. Dabei werden sowohl pharmazeutisch relevante Moleküle, als auch komplexe biologische Analytgemische untersucht. In diesem Zusammenhang ist die Funktionalisierung mit stabilen Monolagen, sogenannten *self assembled monolayers* (SAMs) interessant. Eine solche Funktionalisierung kann, je nach Fragestellung, mehrere Funktionen erfüllen. Durch Bindung der Analytmoleküle kann der Analyt in die Nähe der Nanopartikel gebracht werden, so dass eine Detektion mittels SERS ermöglicht wird<sup>[60,61,62]</sup>. Die Anbindung kann aber auch Fluktuationen in den SERS-Signalen, die durch unterschiedliche Wechselwirkungen der Analytmoleküle mit den Nanopartikeln verursacht werden, verhindern.

## 2. SERS – Raman-Streuung im lokalen Feld

SERS wurde erstmals 1974 von Fleischmann<sup>[63]</sup> bei der Untersuchung von adsorbierten Pyridinmolekülen auf einer aufgerauten Silberelektrodenoberfläche beobachtet. Er führte die Verstärkung der Raman-Signale jedoch auf eine vergrößerte Anzahl von Pyridinmolekülen, aufgrund der größeren Oberfläche durch den Aufrauungsprozess, zurück. So waren es Jeanmaire und Van Duyne<sup>[64]</sup> sowie Albrecht und Creighton<sup>[41]</sup>, die unabhängig voneinander erkannten, dass die Ursache für die Verstärkung der Raman-Signale auf eine Verstärkung des elektromagnetischen Feldes in der Nähe der Nanostrukturen zurückzuführen ist. Moskovits war der Erste, der den Zusammenhang zwischen der Oberflächenplasmonenresonanz und der Verstärkung der Signale im SERS-Experiment untersuchte<sup>[65]</sup>.

Ist die Anregungswellenlänge in Resonanz mit den Oberflächenplasmonen der Nanostrukturen, wird das lokale elektrische Feld an der Nanopartikeloberfläche und dessen unmittelbarer Nähe sehr groß<sup>[5,6,7,16,65,66]</sup>. Befindet sich ein Molekül in dem verstärkten optischen Feld der Nanostruktur, wird die Intensität seiner Raman-Signale erhöht. Wenn das elektrische Feld der Raman-Streustrahlung seinerseits in Resonanz mit den Oberflächenplasmonen ist, wird dieses ebenfalls verstärkt. Die Erhöhung der Intensität der Raman-Signale aufgrund des hohen lokalen Feldes in der Nähe der Nanostrukturen wird als elektromagnetische Verstärkung bezeichnet.

Neben der elektromagnetischen Verstärkung trägt auch die sogenannte chemische Verstärkung zur Erhöhung der Intensität der Raman-Signale im SERS-Experiment bei. Die chemische Verstärkung beruht darauf, dass Moleküle, die auf der Oberfläche einer Metallnanostruktur adsorbiert sind, einen erhöhten Raman-Querschnitt aufweisen. Die Intensität im SERS-Experiment ergibt sich wie folgt:

$$I_{SERS}(\nu_S) = N_{SERS} \cdot I_0 \cdot |A(\nu_0)|^2 \cdot |A(\nu_S)|^2 \cdot \sigma_{ads}^R \quad (1)$$

$A(\nu_0)$  und  $A(\nu_S)$  sind die Feldverstärkungsfaktoren für das Anregungsfeld und das Raman-gestreuete Feld,  $\sigma_{ads}^R$  entspricht dem Raman-Streuquerschnitt der auf der Metalloberfläche adsorbierten Moleküle,  $N_{SERS}$  ist die Anzahl an Molekülen, die zum SERS-Prozess beitragen und  $I_0$  ist die Intensität des Anregungsfeldes.

Die Mechanismen, die der elektromagnetischen und chemischen Verstärkung zugrunde liegen, wie Verstärkungsfaktoren bestimmt werden können und wie die Verstärkung von den plasmonischen Eigenschaften der Metallnanopartikel abhängt, werden in den Abschnitten 2.2 - 2.4 ausführlicher diskutiert. Zunächst sollen ein paar wichtige Aspekte zur Raman-Streuung erläutert werden.

### 2.1 Raman-Streuung

Bei der Raman-Streuung handelt es um einen unelastischen Streuprozess. Dabei treten verschiedene Fälle auf, die in Abbildung 2-1 schematisch dargestellt sind. Wenn monochromatisches Licht auf Materie stößt, wird es mit einer geringen Wahrscheinlichkeit gestreut. Ist das Objekt (z.B. ein Molekül), an dem gestreut wird, sehr viel kleiner als die Wellenlänge des Lichts und hat das gestreute Licht die gleiche Frequenz wie das eingestrahlte Licht, spricht man von Rayleigh-Streuung. Der in der Abbildung 2-1 dargestellte virtuelle Zustand muss dabei kein echter quantenmechanischer Zustand sein, sondern kann vielmehr als sehr kurzlebige Verformung der Elektronenwolke (Polarisation) des Moleküls durch die Oszillation des elektrischen Feldes der Lichtwelle aufgefasst werden. Die Elektronenwolke des Moleküls kann auch durch molekulare Schwingungen beeinflusst werden, wodurch es ebenfalls zu Oszillationen der Elektronenwolke kommt. Kommt es zu einer Überlagerung der Oszillationen, die durch Molekülschwingungen und das Licht bewirkt werden, entsteht Raman-Streuung (Abbildung 2-1). Bei der Raman-Streuung unterscheidet man zwei Fälle:

- 1) Das Molekül verbleibt nach der Streuung in einem angeregten Schwingungszustand. Dann spricht man von Stokes-Raman-Streuung und die Frequenz des gestreuten Lichts ist niedriger, als die des eingestrahnten Lichts.
- 2) Das Molekül befindet sich bereits in einem angeregten Schwingungszustand. Hier spricht man von Anti-Stokes-Raman-Streuung und die Frequenz des gestreuten Lichts ist höher, als die des eingestrahnten Lichts.

In der klassischen Beschreibung der Raman-Streuung wird durch das elektrische Feld der Lichtwelle im Molekül ein Dipolmoment  $\mu_{\text{ind}}$  induziert. Die Stärke des induzierten Dipolmoments ist abhängig von der elektrischen Feldstärke des Anregungsfeldes  $E_0$  und der Polarisierbarkeit  $\alpha$ .

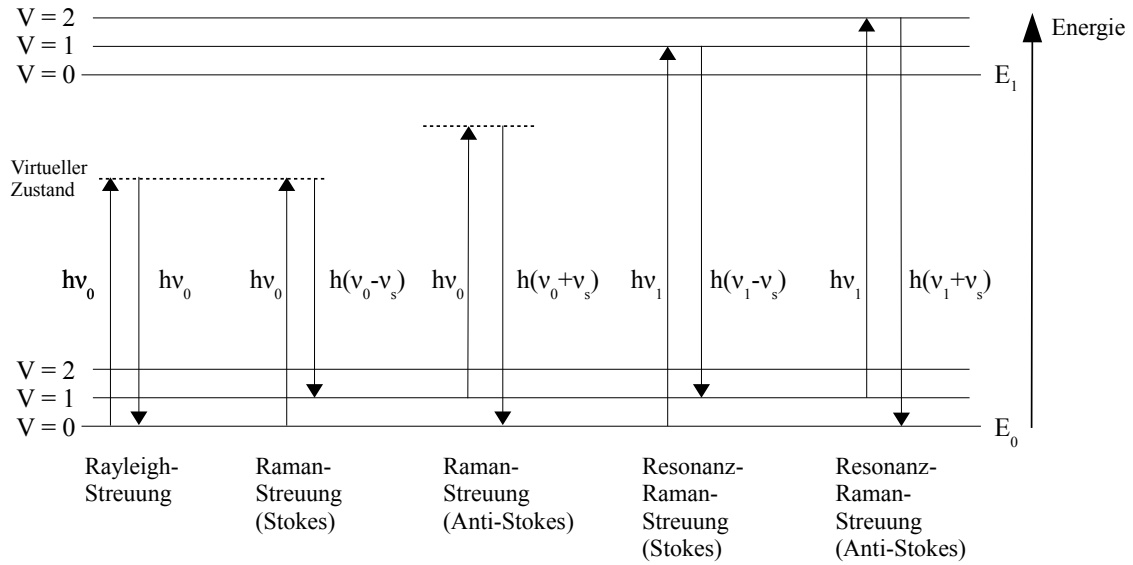


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Prozesse bei der Rayleigh-, Raman- und Resonanz-Raman-Streuung.  $E_0$  und  $E_1$  entsprechen dem elektronischen Grundzustand bzw. ersten angeregtem elektronischen Zustand im Molekül und  $V$  ist die Schwingungsquantenzahl.

Ändert sich das induzierte Dipolmoment mit der gleichen Frequenz  $\nu_0$  wie das anregende elektromagnetische Feld, so wird Strahlung gleicher Frequenz emittiert (Rayleigh-Streuung). Führt das Molekül mechanische Schwingungen mit der Frequenz  $\nu_s$  aus, ändert sich die Polarisierbarkeit des Moleküls und damit das induzierte Dipolmoment und tritt Raman-Streuung auf:

$$\mu_{ind} = \alpha \cdot E_0 \cdot \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} A_k E_0 \left( \frac{\partial \alpha}{\partial Q_k} \right)_0 [\cos(2\pi(\nu_0 - \nu_s) t) + \cos(2\pi(\nu_0 + \nu_s) t)] \quad (2)$$

$Q_k$  ist dabei die Normalkoordinate und  $A_k$  beschreibt die Amplitude der Auslenkung der beteiligten Atome bei der Normalschwingung  $k$ . Der erste Term der Gleichung beschreibt die Rayleigh-Streuung mit der Frequenz  $\nu_0$  und der zweite Term die Stokes- ( $\nu_0 - \nu_s$ ) und die Anti-Stokes-Raman-Streuung ( $\nu_0 + \nu_s$ ).

Die Intensität der Ramansignale eines zufällig orientierten Moleküls hängt von der Intensität des eingestrahnten Lichts  $I_0$ , der Frequenz des gestreuten Lichts  $\nu_s$  und der Polarisierbarkeit  $\alpha_{ij}$  ab.

$$I_R = \frac{8\pi}{9c^4} I_0 \nu_s^4 \sum_{ij} |\alpha_{ij}|^2 \quad (3)$$

In der quantenmechanischen Beschreibung entspricht die Polarisierbarkeit einem Element des Streutensors und ergibt sich aus der Kramers-Heisenberg-Dirac-Dispersionsgleichung<sup>[67]</sup>:

$$(a_{ij})_{mn} = \frac{1}{h} \sum_e \left[ \frac{(M_j)_{me} (M_i)_{en}}{\nu_e - \nu_0} + \frac{(M_i)_{me} (M_j)_{en}}{\nu_e + \nu_s} \right] \quad (4)$$

Dabei sind m und n Ausgangs- und Endzustand des Moleküls, e ein angeregter Zustand und es wird über alle angeregten Zustände summiert.  $(M_j)_{me}$  und  $(M_i)_{en}$  sind elektronische Übergangsdipolmomente, entlang der Richtungen i und j, von m nach e und e nach n,  $\nu_e$  ist die Frequenz des Übergangs von m nach e und  $\nu_0$  und  $\nu_s$  sind die Frequenzen der eingestrahlten und gestreuten Photonen.

Ist die Anregungswellenlänge in Resonanz mit einem oder mehreren elektronischen Übergängen im Molekül so gilt  $\nu_0 \approx \nu_e$  und der erste Term in der Kramers-Heisenberg-Dirac-Dispersionsgleichung (Gleichung 4) wird sehr groß. Die Anregung erfolgt dann nicht in ein virtuelles Niveau, sondern in einen elektronisch angeregten Zustand (Resonanz-Raman in Abbildung 2-1) und die Signale werden um bis zu  $10^3$  verstärkt<sup>[68]</sup>. Das Auftreten und der Beitrag der Resonanzverstärkung hängen von der Anregungswellenlänge und den Eigenschaften des Moleküls ab.

In analytischen Anwendungen der Raman-Spektroskopie spielt der empirisch bestimmte Streuquerschnitt  $\sigma$  eine große Rolle. Der Streuquerschnitt gibt an, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein einfallendes Photon mit einer bestimmten Raman-Verschiebung gestreut wird.

Die Raman-Intensität ergibt sich dann aus der Anzahl der streuenden Moleküle, der Laserintensität  $I_0$  und dem Raman-Querschnitt  $\sigma_R$ :

$$I_{Raman}(\nu_s) = N_R \cdot I_0 \cdot \sigma_R \quad (5)$$

Das Verhältnis der Intensität von Stokes- und Anti-Stokes-Ramanstreuung ergibt sich aus der Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Molekül im angeregten Zustand befindet. Diese

Wahrscheinlichkeit ist durch die Boltzmann-Verteilung gegeben. Für nichtentartete Energieniveaus entspricht das Intensitätsverhältnis von Stokes- zu Anti-Stokes-Ramanstreuung:

$$\frac{I_R(\nu_0 + \nu_s)}{I_R(\nu_0 - \nu_s)} = \frac{(\nu_0 + \nu_s)^4}{(\nu_0 - \nu_s)^4} e^{-\frac{h\nu_s}{kT}} \quad (6)$$

Aufgrund der geringen Intensität der Anti-Stokes-Raman-Streuung wird in analytischen Anwendungen meist die Stokes-Raman-Streuung verwendet.

## 2.2 Ursache der Verstärkung im SERS

Wie bereits in der Einleitung dieses Kapitels beschrieben, setzt sich die Verstärkung im SERS im Wesentlichen aus zwei Beiträgen zusammen: der elektromagnetischen Verstärkung und der sogenannten chemischen Verstärkung.

Die elektromagnetische Verstärkung beruht, wie auch bereits diskutiert, auf der Resonanz zwischen dem einfallenden oder Raman-gestreuten Licht und den Oberflächenplasmonen des Metallpartikels. Das elektrische Feld in der unmittelbaren Nähe des Metallnanopartikels kann nach der Mie-Theorie<sup>[69]</sup> durch Lösen der Maxwell-Gleichungen berechnet werden. Für einen sphärischen Nanopartikel, dessen Radius  $r$  sehr viel kleiner als die Wellenlänge des Lichts  $\lambda$  ist ( $r / \lambda < 0,1$ ), wird die Stärke des elektrischen Feldes um den Nanopartikel stationär und die Maxwell-Gleichungen können mit einem quasi-stationären Ansatz gelöst werden<sup>[70]</sup>. Das elektromagnetische Feld  $E_{ind,d}$  im Abstand  $d$  zur Oberfläche eines Nanopartikels mit Radius  $r$  bei Anregung mit einem elektromagnetischen Feld der Stärke  $E_0$  entspricht:

$$E_{ind,d}(\nu_0) = \frac{\varepsilon_M - \varepsilon_R}{\varepsilon_M + 2\varepsilon_R} \cdot E_0 \cdot \left( \frac{r}{r + d} \right)^3 \quad (7)$$

mit den Dielektrizitätskonstanten  $\varepsilon$  und  $\varepsilon_0$  des Metallnanopartikels bzw. des umgebenden Mediums.

Befindet sich ein Molekül in einem Abstand  $d$  von der Oberfläche des Nanopartikels wirkt die Summe aus beiden elektrischen Feldern:  $E_{ind,d}(\nu_0) + E_0(\nu_0)$ . Das elektrische Feld regt das Molekül zu Schwingungen an. Die vom Molekül emittierte Strahlung ist, im Vergleich zur eingestrahlten Frequenz  $\nu_0$ , frequenzverschoben ( $\nu_s$ ) und entspricht der

Raman-Streustrahlung. Sofern die Oberflächenplasmonen auch in Resonanz zu  $\nu_s$  stehen, induziert das elektrische Feld der Streustrahlung  $E_R(\nu_s)$  nun innerhalb des Metallnanopartikels ebenfalls ein Dipolmoment und damit ein elektrisches Feld  $E_{ind}(\nu_s)$ . Es findet eine Verstärkung des Anregungsfeldes und des frequenzverschobenen Feldes statt. Aktuellere Modelle behandeln die Substratoberfläche als fraktale Struktur statt als Kugel<sup>[71]</sup>, weil dadurch eine höhere Genauigkeit erreicht wird und auch andere Formen von Partikeln beschrieben werden können.

Die Verstärkung des Feldes wird durch den Feldverstärkungsfaktor  $A(\nu)$  ausgedrückt, der sich aus dem Quotienten des induzierten elektrischen Feldes und des Anregungsfeldes ergibt:

$$A(\nu) = \frac{E_{ind}(\nu_0)}{E_0} = \frac{\varepsilon - \varepsilon_0}{\varepsilon + 2\varepsilon_0} \cdot \left( \frac{r}{r+d} \right)^3 \quad (8)$$

Die Feldintensität wird aus dem Betragsquadrat der Feldstärke berechnet. Für den elektromagnetischen Intensitätsverstärkungsfaktor ( $G_{em}(\nu_s)$ ) gilt deshalb:

$$G_{em}(\nu_s) = |A(\nu_L)|^2 |A(\nu_s)|^2 \sim \left| \frac{\varepsilon(\nu_L) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\nu_L) + 2\varepsilon_0} \right|^2 \cdot \left| \frac{\varepsilon(\nu_s) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\nu_s) + 2\varepsilon_0} \right|^2 \cdot \left( \frac{r}{r+d} \right)^{12} \quad (9)$$

Aus Gleichung 27 folgt, dass der Beitrag der elektromagnetischen Verstärkung mit  $1/d^{12}$  abnimmt. Daher tritt die Verstärkung nur sehr lokal in der Nähe der Nanostrukturoberfläche auf. Die elektromagnetische Verstärkung macht mit einem Verstärkungsfaktor von  $10^6 - 10^8$  in der Regel den größten Anteil an der Verstärkung im SERS-Experiment aus<sup>[72,73,74]</sup>.

Die chemische Verstärkung ist noch kurzreichweitiger. Sie tritt nur dann auf, wenn das Molekül direkt an der Metalloberfläche gebunden ist. Sie wird deshalb auch häufig als *first-layer effect* bezeichnet.

Es spielen zwei Mechanismen eine Rolle:

- 1) Verstärkung aufgrund einer Änderung der Polarisierbarkeit des Moleküls durch Ladungstransfer vom Molekül zum Metall



## 2) Charge-Transfer-Verstärkung (CT-Verstärkung) durch Resonanz der Anregungswellenlänge mit einem CT-Übergang<sup>[75]</sup>

Der Anteil der chemischen Verstärkung zur Gesamtverstärkung ist oft schwierig zu bestimmen, weil SERS-Experimente in der Regel unter Bedingungen durchgeführt werden, in denen zusätzlich elektromagnetische Verstärkung auftritt. Der Anteil der chemischen Verstärkung hängt von den Eigenschaften des Moleküls, der Orientierung des Moleküls zum Nanopartikel und der Beschaffenheit der Nanostrukturen ab. Untersuchungen zum Ladungstransfer von Kristallviolett auf Goldfilmen in Abhängigkeit der Morphologie der Goldfilme mittels *transient-grating spectroscopy* (TRG-Spektroskopie) haben gezeigt, dass die Rauigkeit der Goldfilme einen Einfluss auf das Ausmaß des Ladungstransfers zwischen Molekül und Metall und auf die SERS-Intensität hat<sup>[76]</sup>. In Experimenten mit Pyromellitsäuredianhydrid, das auf einer glatten Kupfer(111)-Oberfläche adsorbiert wurde und in denen der Beitrag der elektromagnetischen Verstärkung sehr klein ist, wurde ein Verstärkungsfaktor von 30 bestimmt<sup>[77]</sup>. Die Bestimmung des Verstärkungsfaktors von Pyridin auf unaggregierten Goldnanostäbchen bei Anregung mit einer Wellenlänge außerhalb der Plasmonenresonanz (1064 nm) ergab einen Verstärkungsfaktor von  $10^5$ <sup>[78]</sup>. In theoretischen Berechnungen der chemischen Verstärkung wurde für Pyridin auf einem Ag<sub>20</sub>-Cluster bzw. einem Au<sub>20</sub>-Cluster eine chemische Verstärkung von max. 10 ermittelt<sup>[79]</sup>, während für Pyrazin auf einem Ag<sub>20</sub>-Cluster eine chemische Verstärkung von  $10^2$  gefunden wurde<sup>[80]</sup>. Befindet sich das Pyrazin in der „Lücke“ zwischen zwei Clustern wurde sogar eine chemische Verstärkung von  $10^5$  vorhergesagt.

Hinzu kommt, dass es bei einem CT-Prozess drei Möglichkeiten gibt<sup>[81]</sup>, wie der CT stattfinden kann:

- 1) Resonanter Molekül-Metall-Transfer aus dem Molekül-Grundzustand in einen unbesetzten Energiezustand des Metalls bzw. resonanter Metall-Molekül-Transfer von einem voll besetzten Energiezustand des Metalls in einen energetisch angeregten Zustand des Moleküls (A-Term).

Dieser Term ist mit der Frank-Condon-Näherung verbunden, nach der der elektronische Übergang vertikal ohne Änderung der Position der Kerne, im Molekül stattfindet. Damit dieser Term ungleich Null ist, muss sowohl das Übergangsdipolmoment als auch das Überlappungsintegral der beiden Zustände

ungleich Null sein. Die erste Bedingung ist erfüllt, wenn die Anregungswellenlänge in der Nähe einer intensiven CT- oder  $\pi\text{-}\pi^*$ -Absorptionsbande liegt.

Die zweite Bedingung ist nur für total-symmetrische Schwingungen erfüllt, da sie auf einer Verschiebung der potentiellen Energieminima entlang der Normal-koordinate während des Übergangs beruht. Der A-Term trägt nur zur Intensität total-symmetrischer Schwingungen bei.

- 2) Molekül-Metall-Transfer vom Molekül-Grundzustand in einen unbesetzten Energiezustand des Metalls (B-Term, Abbildung 2-2).

Dieser Term beruht auf dem Herzberg-Teller-Effekt und ist abhängig von der Wechselwirkung zwischen Bewegungen der Elektronen und Kerne.

- 3) Metall-Molekül-Transfer von einem besetzten Energiezustand des Metalls in einen angeregten Zustand des Moleküls (C-Term).

Der Beitrag der jeweiligen Terme (A - C) zur chemischen Verstärkung hängt von der Symmetrie und der Orientierung des Moleküls auf der Metalloberfläche ab.

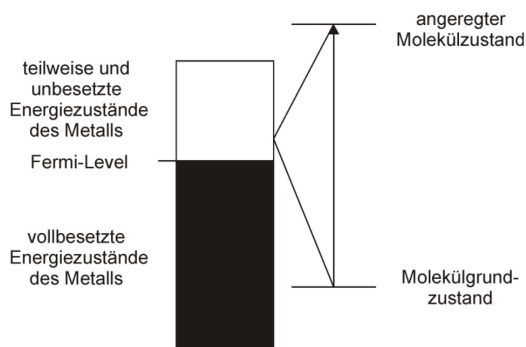


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Energiezustände in einem Molekül-Metall-System mit einem erlaubten Übergang zwischen dem Molekülgrundzustand und dem angeregten Molekülzustand. Die Abbildung zeigt einen Elektronentransfer vom Molekül zum Metall.

### 2.3 Abhängigkeit der SERS-Verstärkung von den plasmonischen Eigenschaften der Nanostrukturen

Aus Gleichung 1 folgt, dass die höchste SERS-Verstärkung erhalten wird, wenn sowohl das Anregungsfeld, als auch das Raman-gestreuete Feld, verstärkt werden. Dies wird erreicht, wenn beide Felder in Resonanz zu den Oberflächenplasmonen stehen. Die Entwicklung von durchstimmbaren Lasern, die eine Anregung bei verschiedenen Wellenlängen ermöglichen, und die Möglichkeit, Nanostrukturen definierter Größe und Form über nanolithographische Verfahren herstellen zu können, erlauben die systematische

Untersuchung des elektromagnetischen Beitrags zur SERS-Verstärkung in Abhängigkeit der Oberflächenplasmonenresonanz<sup>[17,82,83,84]</sup>.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die höchste SERS-Verstärkung erreicht wird, wenn die Oberflächenplasmonenresonanz zwischen der Anregungswellenlänge und der Wellenlänge der Raman-Streustrahlung liegt<sup>[17,82,83,84,85]</sup>. Das ist in guter Übereinstimmung mit der Theorie<sup>[5,6,7,16,65,66]</sup>. Bei der Betrachtung der Wellenlängenabhängigkeit der SERS-Verstärkung muss berücksichtigt werden, dass die Verstärkung von den Nahfeldeigenschaften der Metallnanopartikel bestimmt wird und diese von den Fernfeldeigenschaften abweichen können. Als Nahfeldbereich wird der Bereich bezeichnet, für den gilt  $d \leq r$ , wobei  $r$  der Radius des Nanopartikels ist und  $d$  der Abstand zwischen Nanopartikel und Punkt im Raum, an dem das Feld betrachtet wird. Die Fernfeldeigenschaften von Metallnanopartikeln werden über den Extinktionsquerschnitt  $\sigma_{\text{ext}}$  beschrieben, der sich aus dem Streuquerschnitt  $\sigma_{\text{scat}}$  und der Absorption  $\sigma_{\text{abs}}$  zusammensetzt und in Extinktionsmessungen bestimmt wird. Diese werden im Abschnitt 2.5 ausführlicher diskutiert. Die Nahfeldeigenschaften werden über den Nahfeldquerschnitt  $\sigma_{\text{NF}}$  definiert<sup>[66]</sup>. Der Nahfeldquerschnitt gibt die Fähigkeit des Partikels an, ein einfallendes elektrisches Feld in Nahfeldintensität zu überführen. Theoretische Berechnungen von  $\sigma_{\text{ext}}$  und  $\sigma_{\text{NF}}$  haben gezeigt, dass die Querschnitte für Silbernanopartikel übereinstimmen, während bei Goldnanopartikeln  $\sigma_{\text{NF}}$  im Vergleich zu  $\sigma_{\text{ext}}$  zu größeren Wellenlängen verschoben ist<sup>[66]</sup>.

Die plasmonischen Eigenschaften der Metallnanopartikel, wie Lage und Breite der Plasmonenbande, werden durch die morphologischen Eigenschaften der Nanopartikel, wie Größe und Form, bestimmt<sup>[85,86,87]</sup>.

## 2.4 Bestimmung von Verstärkungsfaktoren

Der Verstärkungsfaktor gibt an, wie viel intensiver ein Raman-Signal in Gegenwart der Nanostruktur ist. Da in der Regel für die Raman- und SERS-Messungen nicht die gleichen Konzentrationen an Analyt verwendet werden können, müssen diese in der Berechnung des Verstärkungsfaktors berücksichtigt werden.

Aufgrund der schlechten Löslichkeit vieler Analytmoleküle wird als Referenz für das Raman-Signal häufig Methanol verwendet<sup>[88,89]</sup>, weil dieses keine Verstärkung durch die Nanostrukturen erfährt. Bei dieser Methode muss berücksichtigt werden, dass die Streuquerschnitte von Methanol und dem Analytmolekül unterschiedlich sein können, was zu

einer Überbestimmung des Verstärkungsfaktors führt<sup>[90]</sup>. Deshalb sollte für die Bestimmung des Verstärkungsfaktors ein Molekül ausgewählt werden, von dem sowohl ein Raman-, als auch ein SERS-Spektrum, erhalten werden kann.

Bei der Bestimmung von Verstärkungsfaktoren muss zudem beachtet werden, dass zum SERS-Signal nur solche Moleküle beitragen, die sich in unmittelbarer Nähe zur Oberfläche der Nanostrukturen befinden, während zum Raman-Signal alle Moleküle im Fokusvolumen beitragen. Um die Anzahl von Molekülen, die zur Intensität der SERS-Signale beitragen und damit den Verstärkungsfaktor bestimmen zu können, muss die Oberflächenrauigkeit (Anzahl der Nanopartikel pro Fläche, sowie Größe und Form der Nanopartikel) sowie der Platzbedarf des entsprechenden Analytmoleküls auf der Metalloberfläche bekannt sein oder bestimmt werden. Da dies in vielen Fällen nicht möglich ist, handelt es sich beim Verstärkungsfaktor in der Regel um eine Abschätzung. Dennoch kann er zur Charakterisierung und zum Vergleich unterschiedlicher SERS-Substrate herangezogen werden. Die Abschätzung erfolgt nach folgender Gleichung:

$$EF = \frac{I_{SERS} \cdot N_{RS}}{I_{RS} \cdot N_{SERS}} \quad (10)$$

mit der Anzahl  $N_{RS}$  und  $N_{SERS}$  der zur Intensität des SERS- bzw. Raman-Signals  $I_{SERS}$  und  $I_{RS}$  beitragenden Moleküle.

## 2.5 Charakterisierung von Metallnanostrukturen

Ziel dieser Arbeit ist ein Verständnis des Zusammenhangs zwischen den physikochemischen Eigenschaften von Nanostrukturen und ihren Eigenschaften im SERS-Experiment zu schaffen. Dazu ist es notwendig, die Nanopartikeleigenschaften zu charakterisieren.

Die plasmonischen Eigenschaften der Nanostrukturen lassen sich anhand von Extinktionsspektren ermitteln. Nach der Mie-Theorie<sup>[69]</sup> setzt sich die Extinktion von Partikeln, deren Radius viel kleiner als die Wellenlänge des Lichts ist, aus der Absorption und der Streuung zusammen. Für sphärische Partikel kann der Extinktionsquerschnitt  $\sigma_{\text{ext}}$ , der Absorptionsquerschnitt  $\sigma_{\text{abs}}$  und der Streuquerschnitt  $\sigma_{\text{scat}}$  über folgende Gleichungen berechnet werden:

$$\sigma_{ext}(\lambda) = \sigma_{scat}(\lambda) + \sigma_{abs}(\lambda) \quad (11)$$

$$\sigma_{abs}(\lambda) = \frac{8\pi^2 r^3}{\lambda} \cdot \left| \text{Im} \left( \frac{\varepsilon - \varepsilon_0}{\varepsilon + 2\varepsilon_0} \right) \right| \quad (12)$$

$$\sigma_{scat}(\lambda) = \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \cdot \left| \frac{\varepsilon - \varepsilon_0}{\varepsilon + 2\varepsilon_0} \right|^2 \quad (13)$$

$\varepsilon$  ist die Dielektrizitätskonstante des Metalls und setzt sich aus einem Realteil  $\varepsilon'$  und einem Imaginärteil  $\varepsilon''$  zusammen:

$$\varepsilon = \varepsilon' + i\varepsilon'' \quad (14)$$

$\varepsilon_0$  ist die Dielektrizitätskonstante des umgebenden Mediums. Die Gleichungen zeigen, dass der Beitrag von Streuung und Absorption zur Extinktion von der Wellenlänge des Lichts  $\lambda$  und dem Radius  $r$  der Partikel abhängt. Aufgrund der Abhängigkeit des Extinktionsquerschnitts vom Radius der Partikel kann anhand der Lage des Extinktionsmaximums sowie der Breite der Bande im Extinktionsspektrum der Durchmesser und die Größenverteilung der Partikel abgeschätzt werden<sup>[91]</sup>. Die Extinktion hat ihr Maximum bei der Wellenlänge, für die gilt:  $\varepsilon = -2\varepsilon_0$ . Für Gold, Silber und Kupfer ist diese Bedingung für Wellenlängen im sichtbaren Spektralbereich erfüllt<sup>[92]</sup>.

Befinden sich Nanostrukturen in unmittelbarer Nähe zueinander, wie z.B. in Aggregaten oder in dicht gepackten Lagen auf Oberflächen, kommt es zu Mehrfachresonanzen, die zu einer erweiterten Plasmonenbande im Extinktionsspektrum führen<sup>[93]</sup>. Die Lage der erweiterten Plasmonenbande hängt von der Größe und Geometrie der Aggregate ab<sup>[94,95,96]</sup>, sodass Extinktionsspektren zur Abschätzung des Ausmaßes der Aggregation von Nanopartikeln herangezogen werden können. Der elektromagnetische Beitrag zur Verstärkung im SERS-Experiment beruht auf einer Wechselwirkung der Oberflächenplasmonen mit dem elektromagnetischen Feld der einfallenden Lichtwelle und hängt von den optischen Eigenschaften der Nanostrukturen ab. Durch Untersuchungen der SERS-Verstärkung in Abhängigkeit der Extinktion von Silberinselfilmen ist es Weitz et al. gelungen, einen Zusammenhang zwischen dem elektromagnetischen Beitrag zur Verstärkung im SERS-Experiment und der plasmonischen Eigenschaften der Filme herzustellen<sup>[97]</sup>. Damit kann aus den Extinktionsspektren der elektromagnetische Beitrag

abgeschätzt werden, wie in Abschnitt 4.3 diskutiert wird. Mit der UV/Vis-Spektroskopie können sowohl Flüssigkeiten als auch transparente Schichten, untersucht werden.

Für die Bestimmung von Form, Größe und Polydispersität sowie der Rauigkeit von Oberflächen werden in der Literatur häufig Informationen aus bildgebenden Verfahren, wie Transmissions- (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) sowie Rasterkraft- (SFM) und Rastertunnelmikroskopie (STM), herangezogen<sup>[55,98,99,100]</sup>. Die Bildgebung erfolgt bei REM und TEM durch Detektion von gestreuten oder gebeugten Elektronen. Mit REM wird üblicherweise eine Auflösung von bis zu 10 nm erreicht, während bei TEM eine Auflösung bis 0,1 nm erreicht werden kann. REM ist für die Untersuchung größerer Flächen geeignet, jedoch muss die Probe leitend sein, damit es nicht zu einer Aufladung der Probe durch die Elektronen kommt. Sollen nicht-leitende Proben untersucht werden, muss die Probe vorher mit Kohlenstoff oder Gold bedampft werden. Für die Aufnahme von TEM-Bildern muss die Probe sehr dünn sein (max. 200 nm) was, je nach Probe, einen hohen präparativen Aufwand bei der Probenvorbereitung bedeuten kann.

SFM und STM ermöglichen die Untersuchung der Höhe von Nanostrukturen auf Oberflächen mit einer Auflösung von 0,1 – 10 nm. Bei SFM können die Oberflächen sowohl Leiter als auch Isolatoren sein, was die Untersuchung nicht-leitender Proben ohne Probenvorbereitung ermöglicht. Für STM-Untersuchungen muss die Probe leitfähig sein oder mit einer dünnen Schicht eines leitenden Materials bedampft werden. Die Höheninformation wird bei SFM durch die Kraft zwischen der Oberfläche der Nanostrukturen und einer sehr dünnen Spitze ermittelt, während bei STM der Tunnelstrom zwischen der Spitze und der Probe gemessen wird. Die Messungen können in mehreren Modi erfolgen: Kontaktmodus (auch statischer Modus genannt), intermittierender Modus (Tapping bzw. Intermittent Contact Mode) und Nicht-Kontakt-Modus. Beim Kontaktmodus wird die Spitze in Kontakt mit der Probenoberfläche gebracht. Durch den elektronischen Überlapp der Orbitale der Atome am Ende der Spitze und der Probenoberfläche sowie der elektrostatischen Abstoßung der elektrisch negativ geladenen Elektronenwolken wirkt eine starke, repulsive Kraft auf die Spitze, wodurch es zu einer Auslenkung des *cantilevers*, an dessen Ende sich die Spitze befindet, kommt. In diesem Modus kann es leicht zu einer Beschädigung der Probe und der Spitze kommen. Im intermittierenden Modus bzw. Tapping Modus oszilliert die Spitze mit relativ hoher

Amplitude (z.B. 20 nm). In jedem Zyklus berührt die Spitze die Oberfläche, wodurch die Schwingungsamplitude abhängig von der Höhe der Probe gedämpft wird.

Die Dämpfung der Schwingungsamplitude wird konstant gehalten, indem die Höhe des *cantilevers* angepasst wird. Im *Nicht-Kontakt-Modus* wird die Spitze in unmittelbare Nähe zur Probe gebracht, (Abstand einige nm) ohne mit ihr in Kontakt zu kommen. Der *cantilever* wird über ein Piezoelement in Schwingung versetzt, wobei eine Frequenz gewählt wird, die nahe an der Resonanzfrequenz ist. Bei Annäherung an die Probenoberfläche wird die Amplitude durch schwache, anziehende van-der-Waals-Kräfte, die an der Grenzfläche zwischen Probe und Spitze wirken, erhöht. Die Höhe des *cantilevers* wird nun jeweils so angepasst, dass eine konstante Amplitude erreicht wird, was dazu führt, dass die Probe nie in direktem Kontakt mit der Spitze ist. So werden mechanische Beschädigungen der Probe vermieden.

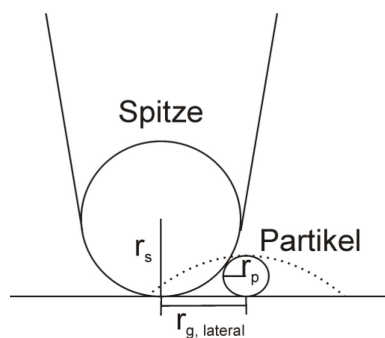


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Spitzenverbreiterung, die in SFM-Messungen auftreten kann, wenn ein Partikel mit Radius  $r_p$  mit einer Spitze mit Radius  $r_s$  untersucht wird.

Ein Effekt, der in SFM-Aufnahmen auftritt, ist die sogenannte Spitzenverbreiterung, die dazu führt, dass es zu erheblichen Abweichungen zwischen der Breite eines Objekts und der Breite der Abbildung des Objekts kommen kann. Die Ursache für die Spitzenverbreiterung ist der endliche Radius der Spitze. Ein Partikel mit dem Radius  $r_p$  erscheint in der SFM-Aufnahme mit der Breite  $2 \cdot r_{g, \text{lateral}}$ , wenn die Spitze einen Radius von  $r_s$  hat (Abbildung 2-3). Die Spitzenverbreiterung hat keinen Einfluss auf die Höheninformation.

Da viele SERS-Experimente in Lösung durchgeführt werden, ist es häufig von Interesse die Größe, Form und Polydispersität der Nanopartikel in Lösung zu untersuchen. Hierzu können Informationen aus der Röntgenkleinwinkelstreuung (Small Angle X-ray Scattering, SAXS) herangezogen werden. Dabei wird die an den Elektronenhüllen gestreute Röntgenstrahlung in einem kleinen Winkel zum Primärstrahl gemessen

(Abbildung 2-4). Dabei gilt, je größer die Dimensionen der Partikel, an denen die Streuung stattfindet, desto kleiner sind die Winkel, unter denen die Streueffekte zu beobachten sind. Für eine bessere Vergleichbarkeit von Ergebnissen, die mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen durchgeführt wurden, wird statt des Streuwinkels  $\theta$ , der Streuvektor  $q$  verwendet:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda \sin(\theta)} \quad (15)$$

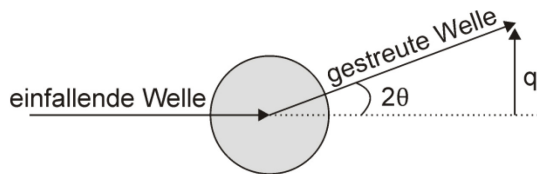


Abbildung 2-4: Schematische Skizze der Streuung eines Röntgenstrahls an einem punktförmigen Streuzentrum innerhalb eines Partikels.

Die Streuintensität nicht-aggregierter Partikel in Abhängigkeit vom Streuvektor ist proportional zur Anzahl der Partikel  $N$ , dem Elektronendichtekontrast zwischen den streuenden Partikeln und dem umgebenden Medium ( $\Delta\rho$ ), dem Volumen des streuenden Partikels  $V$ , dem Formfaktor  $P(q, r)$  und dem Streufaktor  $S(q)$ :

$$I(q) \sim N \Delta\rho^2 V^2 P(q) S(q) \quad (16)$$

Der Formfaktor ist charakteristisch für die Gestalt des Partikels und der Strukturfaktor ist ein Maß für die interpartikulären Wechselwirkungen. Für monodisperse, harte Kugeln ergibt sich die Streuintensität aus dem Guiniergesetz:

$$I_G(q) = \frac{\Delta\rho^2 V^2}{N} \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (17)$$

In der Praxis wird der Guinierradius  $R_g$  über einen Fit der Streuintensität in Abhängigkeit vom Streuvektor aus den Streukurven ermittelt (Beispiel in Abbildung 2-5). Aus dem Guinierradius kann, aus einer von der Geometrie der Partikel abhängigen Gleichung, der Radius der Partikel bestimmt werden. Für kugelförmige Partikel ergibt sich der Radius mit:



$$R^2 = \frac{5}{3} R_g^2 \quad (18)$$

Für polydisperse, sphärische Partikel muss man entweder die Streuintensitäten aller Partikelgrößen, gewichtet anhand ihrer Frequenz, summieren oder man integriert unter Verwendung einer Größenverteilungsfunktion. Dabei ist es üblich, die Schulz-Zimm Verteilung für polydisperse Partikel zu verwenden<sup>[101]</sup>, für die sich die Streuintensität wie folgt ergibt:

$$I(q) = scale \cdot \int_0^{\infty} f(r) P^2(qr) dr \quad (19)$$

Die Messung ist repräsentativ für die gesamte Probe, was dazu führt, dass die Aussagekraft der Röntgenkleinwinkelstreuung mit zunehmender Gestalt- und Größenpolydispersität sinkt. In solchen Fällen müssen zusätzliche Informationen über die Probe, z.B. aus bildgebenden Verfahren, zur Auswertung herangezogen werden.

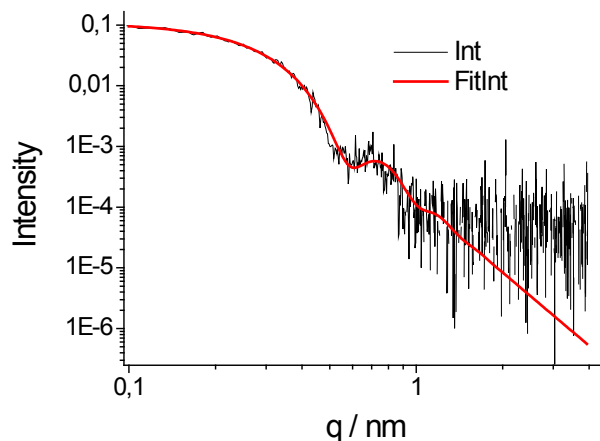


Abbildung 2-5: Beispielhafte Auftragung der Streuintensität in Abhängigkeit des Streuvektors  $q$  einer Goldnanopartikellösung und entsprechender Fit zur Bestimmung der Größe und Polydispersität der Nanopartikel.

Mit Hilfe von SAXS-Untersuchungen in Kombination mit XANES und TEM ist es der Gruppe um F. Emmerling gelungen, den Wachstumsprozess von Goldnanopartikeln bei Reduktion von Tetrachlorgoldsäure mit Natriumcitrat aufzuklären<sup>[102,103,104]</sup>. Aus den neu gewonnenen mechanistischen Erkenntnissen konnten sie eine Methode entwickeln, monodisperse Goldnanopartikel gezielter Größe herzustellen<sup>[103]</sup>. Diese Methode eröffnet neue Möglichkeiten für die Optimierung von Metallnanostrukturen für SERS-Experi-

mente. Erstmals konnte der Zusammenhang zwischen der Größe von Nanostrukturen und ihrer Verstärkung im SERS-Experiment untersucht werden (siehe Abschnitt 4.3). Aufgrund der identischen Oberflächeneigenschaften der Goldnanopartikel war es möglich, den Einfluss der Größe auf die Anordnung der Nanostrukturen in 2-dimensionalen Schichten und ihre Eigenschaften im SERS-Experiment zu untersuchen (siehe Abschnitt 5.3).

In dieser Arbeit sollen verschiedene Nanostrukturen auf Aminosilan-funktionalisierten Oberflächen immobilisiert werden. Die Bindung der Nanopartikel an die funktionalisierte Glasoberfläche beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Aminosilanlinker und den Nanopartikeln und hängt von der Oberflächenladung der Nanopartikel ab<sup>[105]</sup>. Die Art und die Anzahl der Ladungen an der Oberfläche der Nanopartikel werden durch die Herstellungsweise beeinflusst und können über Zeta-Potentialmessungen bestimmt werden. Da die Stabilisierung der Nanopartikel bei vielen Synthesemethoden ebenfalls über eine elektrostatische Abstoßung der Ladungen auf den Oberflächen der Nanopartikel erreicht wird, kann anhand des Zeta-Potentials eine Aussage über die Stabilität der Nanopartikel getroffen werden. Neben der Stabilität der Partikel spielt für die Verstärkung im SERS-Experiment auch die Wechselwirkung des Analytmoleküls mit der Nanopartikeloberfläche eine Rolle. Für eine hohe Verstärkung im SERS-Experiment müssen die Partikel stabil und die Abstoßung zwischen Nanopartikel und Analytmolekül möglichst gering sein<sup>[31,106]</sup>. Befindet sich ein geladener Nanopartikel in Lösung, so kommt es zur Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht, die nach dem Modell von Stern<sup>[107]</sup> aus einer Schicht fest adsorbierter Ionen (Sternschicht) und einer diffusen Schicht von beweglichen Gegenionen (Gouy-Chapman-Schicht) besteht. Bewegt sich der Nanopartikel in der Lösung, so wird die diffuse Schicht ganz oder teilweise abgeschert. Das Potential an dieser Scherebene ist das sogenannte Zeta-Potential. Es wird anhand der Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen im elektrischen Feld  $V_E$  über die von Smoluchowski<sup>[108]</sup> entwickelten Gleichung berechnet:

$$V_E = 4\pi\epsilon_0\epsilon_r \frac{\zeta}{6\pi\mu} (1 + \kappa r) \quad (20)$$

wobei  $\epsilon_0$  und  $\epsilon_r$  die elektrische Feldkonstante und die relative Dielektrizitätszahl,  $\mu$  die Viskosität der Lösung und  $r$  der Partikelradius sind.  $\kappa$  ist der Debye-Hückel-Parameter

$$\kappa = \sqrt{\frac{2n_0 z^2 e^2}{\epsilon_r \epsilon_0 k_B T}} \quad (21)$$

mit der Ionenkonzentration im Festkörper  $n_0$  und der Ladungszahl der Ionen  $z$ .

## 2.6 Finite Differenzen-Methode (FDTD) zur Simulation der Lichtstreuung und des elektrischen Feldes an Nanostrukturen

Auch wenn der Schwerpunkt dieser Arbeit nicht auf der theoretischen Betrachtung und der Simulation elektrischer Felder um Nanostrukturen liegt, so ist es dennoch nützlich, für ein paar ausgewählte Beispiele die Felder von Nanostrukturen zu betrachten, um diese mit den experimentell ermittelten Verstärkungsfaktoren zu vergleichen. Es gibt bereits zahlreiche, umfangreiche theoretische Arbeiten, die sich mit den elektrischen Feldern von kugel- und zylinderförmigen Nanostrukturen befassen<sup>[16,57,74,95,109]</sup>. Die Intensität und Intensitätsverteilung der Felder hängt von der Anordnung, der Form, der Größe und der Zusammensetzung der Nanostrukturen ab, sodass individuelle Betrachtungen nötig sind. In den vergangenen Jahren wurden hierfür vermehrt benutzerfreundliche Software-Anwendungen entwickelt.

Die älteste Methode zur Berechnung der Streuung von Licht an Partikeln, die kleiner als die Wellenlänge des Lichts sind, ist die Mie-Theorie<sup>[69]</sup>. Hierbei werden die Maxwell-Gleichungen exakt gelöst. Sie ist eine analytische Methode und aufgrund des hohen Rechenaufwands auf einzelne, sphärische Partikel beschränkt. Eine Erweiterung der Mie-Theorie, die quasi-stationäre Näherung, ermöglicht die Berechnung anderer Partikelformen, erfordert jedoch ebenfalls einen hohen Rechenaufwand. Deshalb werden heutzutage vorwiegend numerische Methoden zur Lösung der Maxwell-Gleichungen verwendet. Die Verbreitesten sind dabei die finite Differenzen-Methode (*finite difference time domain*, FDTD)<sup>[110]</sup>, die diskrete Dipol-Näherung (*discrete dipole approximation*, DDA)<sup>[111]</sup> und die finite Elementen-Methode (*finite element method*, FEM).

Bei der DDA-Methode werden die Partikel, an denen die Streuung stattfindet, als kubisches Gitter von polarisierbaren Dipolen angenähert. Anschließend werden für jeden Dipol die Maxwell-Gleichungen exakt gelöst. Aufgrund des hohen Rechenaufwands ist die Methode vor allem zur Beschreibung von Objekten geeignet, die kleiner als einige hundert Nanometer sind.

Bei Verwendung von FEM werden die Lösungen der Maxwell-Gleichungen in lokal definierte Basisfunktionen ausgeweitet, die so gewählt werden, dass die Randbedingungen an den Oberflächen der Elemente erfüllt sind. FEM ist ideal für die Simulation irregulärer Strukturen und großer Bereiche mit feinen Strukturen.

FDTD ist die Einfachste der sogenannten exakten Methoden, für die die Maxwell-Gleichungen direkt gelöst werden. Sie wurde in dieser Arbeit für die Simulation der Felder verschiedener Nanostrukturen verwendet. Der Vorteil von FDTD ist, dass auch 3D-Simulationen möglich sind. Aufgrund der Verwendung von diskreten Gittern ist die Methode nicht geeignet für große Bereiche, bei denen feine Strukturen aufgelöst werden müssen.

Die Basis des heute verwendeten FDTD-Algorithmus beruht auf der von Yee<sup>[112]</sup> vorgeschlagenen Methode, wonach der zu untersuchende Raum in Elementquader zerlegt wird (Yee-Zelle). Auf den Elementquadern sind die elektrischen und magnetischen Felder in versetzten Gittern angeordnet (Schematische Darstellung in Abbildung 2-6). Die Fortpflanzung der elektrischen bzw. magnetischen Felder an den Gitterpunkten wird dann in diskreten Zeitschritten durch Lösen der Maxwell-Gleichungen berechnet:

$$\nabla \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} + \sigma \vec{E} \quad (22)$$

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (23)$$

Für isotrope, lineare und unmagnetische Medien hängt die dielektrische Verschiebung  $\vec{D}$  mit der Feldstärke  $\vec{E}$  und der magnetische Fluss  $\vec{B}$  mit der magnetischen Feldstärke  $\vec{H}$  zusammen:

$$\vec{D}(\omega) = \varepsilon_0 \varepsilon(\omega) \vec{E}(\omega) \quad (24)$$

$$\vec{B} = \mu_0 \mu \vec{H} \quad (25)$$

Bei der FDTD-Methode werden die elektromagnetischen Felder separat voneinander in der Zeit berechnet. Die anschließende Überführung in den Frequenzbereich erfolgt mittels Fast Fourier Transformation (FFT). Da jeder Raumpunkt einzeln berechnet wird, muss

der Simulationsbereich endlich sein. Das wird über sogenannte perfectly-matched-layer (PML) erreicht. Es handelt sich dabei um ein uniaxial-anisotropes Material, d.h. dass auftreffende transversale und longitudinale Wellen unabhängig vom Einfallswinkel komplett transmittiert werden. Materialien, die die Wellen reflektieren, würden das Simulationsergebnis beeinflussen.

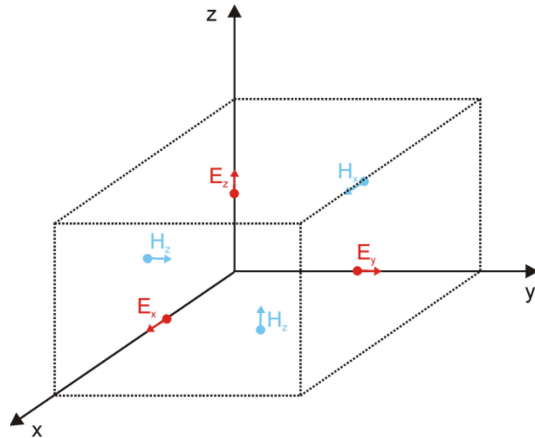


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung einer Yee-Zelle. Die elektrischen Feldkomponenten sind auf den Kanten der Zelle angeordnet und die magnetischen Feldkomponenten auf den Flächen.

In der Simulation muss ein Kompromiss zwischen Dämpfung der Randwellen und Rechenzeit gemacht werden, da eine größere Anzahl von PML-Lagen zwar die Dämpfung aber auch die Rechenzeit, erhöht.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1 Herstellung von Gold-, Silber- und Platinnanopartikeln in Lösung

Die Gold- und Silbernanopartikel wurden nach unterschiedlichen in der Literatur beschriebenen Methoden erzeugt. Außer einer Silbernanopartikelprobe (Probe AgNP4), deren Herstellung durch Laserablation unten beschrieben ist, wurden alle Goldnanopartikel durch chemische Reduktion von Tetrachlorgoldsäure (99,9 %, Aldrich) und alle Silbernanopartikel durch Reduktion von Silbernitrat (99,99 %, Aldrich) unter Verwendung verschiedener Reduktionsmittel synthetisiert.

*Reduktion mit Natriumcitrat.* Im Falle der Goldnanopartikelprobe AuNP1 und der Silbernanopartikel von AgNP1 erfolgte die Reduktion mit 1 %-iger Natriumcitratlösung (mind. 99 %, chem. Solute) bei 100°C nach der Methode von Lee und Meisel<sup>[24]</sup>. Dazu wurde eine Lösung von Tetrachlorgoldsäure (0,375 mM) bzw. Silbernitrat (0,116 mM) vorgelegt, auf 100°C erhitzt und 5 ml der 1%-igen Natriumcitratlösung hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung für 1 h gekocht. Die Goldnanopartikelproben AuNP2 und AuNP3 wurden durch Reduktion von Tetrachlorgoldsäure mit 1 %-Natriumcitrat nach den Methoden von Frens<sup>[113]</sup> bzw. Horisberger<sup>[114]</sup> hergestellt, die sich von der Methode von Lee und Meisel<sup>[24]</sup> durch die Konzentration der Tetrachlorgoldsäure (AuNP2: 1 mM und AuNP3: 0,3 mM) und des Volumens an zugegebener Natriumcitrat-Lösung (AuNP2: 10 ml und AuNP3: 8,5 ml) unterscheiden.

Durch Anwendung einer von Emmerling et al.<sup>[104]</sup> entwickelten Methode wurden zudem monodisperse Goldnanopartikel sechs definierter Radien (7,5 nm, 10 nm, 12,5 nm, 15 nm, 17,5 nm und 20 nm) ebenfalls mittels Reduktion von Tetrachlorgoldsäure mit Natriumcitrat nach der hergestellt. Dazu wurden zunächst kleine Goldnanopartikel (ca. 7 nm) nach der Methode von Turkevich et al.<sup>[115]</sup> synthetisiert, die dann durch gezielte weitere Zugabe von Tetrachlorgoldsäure (0,25 mM) und Natriumcitratlösung (2,5 mM) bis zur gewünschten Größe aufgewachsen wurden.

*Reduktion mit Hydroxylamin-Hydrochlorid.* Die Silbernanopartikel AgNP2 und AgNP3 wurden bei Raumtemperatur durch Reduktion mit einer Lösung von Hydroxylaminhydrochlorid (99 %, Sigma) und Natriumhydroxid (J.T. Baker) nach der Vorschrift von Leopold und Lendl<sup>[116]</sup> erzeugt.

Für die Herstellung von AgNP2 wurden 45 ml Silbernitratlösung ( $1,11 \cdot 10^{-3}$  M) vorgelegt und 5 ml einer Mischung von Hydroxylamin-Hydrochlorid ( $1,5 \cdot 10^{-2}$  M) und Natriumhydroxid ( $3 \cdot 10^{-3}$  M) schnell hinzugegeben, während beim AgNP3 45 ml einer Mischung von Hydroxylamin-Hydrochlorid ( $1,67 \cdot 10^{-3}$  M) und Natriumhydroxid ( $3,33 \cdot 10^{-3}$  M) vorgelegt und 5 ml Silbernitratlösung ( $1 \cdot 10^{-2}$  M) schnell hinzugegeben wurden.

*Reduktion mit Natriumborhydrid.* Für die Herstellung der Silbernanopartikel AgNP5 wurde eine 2 mM Silbernitratlösung unter Kühlung mit einer 1 mM Natriumborhydridlösung (J.T. Baker) (Volumenverhältnis 2:1) durch tropfenweise Zugabe reduziert<sup>[117]</sup>.

*Top-down- Herstellung von Nanopartikeln durch Laserablation massiven Silbers.* Die Herstellung von ablatierten Silbernanopartikeln (Probe AgNP4) erfolgte mittels Laserablation einer Silberfolie in 4 ml Millipore-Wasser. Dazu wurde ein mit 10 Hz gepulster Nd:YAG-Laser (Continuum Minilite II) mit einer Laserwellenlänge von 1064 nm, einer Pulsdauer von 6 ns, einer Wiederholrate von 10 Hz und einer Laserenergie von 17,7 mJ / Puls verwendet. Die Bestrahlungszeit betrug zehn Minuten.

Die Platinnanopartikel wurden über Reduktion von Hexachloroplatinsäure ( $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ ) mit Glucose und Stärke hergestellt<sup>[118]</sup>.

Die Partikelkonzentrationen wurden aus der eingesetzten Menge an Gold bzw. Silber unter der Annahme einer vollständigen Umsetzung, der Dichte des Metalls und der Größe der Partikel, die aus Transmissionselektronenmikroskopieaufnahmen und Experimenten mit dynamischer Lichtstreuung erhalten wurde, bestimmt. Im Fall der über Laserablation hergestellten Silbernanopartikel, bei denen die Menge an Silber nicht bekannt ist, wurde die Partikelkonzentration nach der von Haiss et al.<sup>[91]</sup> entwickelten Gleichung aus der Extinktion A im UV/Vis-Spektrum abgeschätzt:

$$A = \frac{\pi r^2 Q_{\text{ext}} dV}{2,303} \quad (26)$$

mit dem Radius r der Partikel, der Weglänge der Küvette d, dem Einheitsvolumen V und dem Extinktionskoeffizienten  $Q_{\text{ext}}$ .

Der Extinktionskoeffizient für Silbernanopartikel wurde der Literatur<sup>[92]</sup> entnommen.

### **3.2 Immobilisierung der Metallnanopartikel auf Glasoberflächen**

Die für die Immobilisierung verwendeten Glasträger wurden zunächst in einer Mischung aus Wasserstoffperoxid (30 %, Roth) und Schwefelsäure (J.T. Baker, 95 - 97 %) (Volumenverhältnis, 4:1) bei 60°C gereinigt. Anschließend wurden die Träger gründlich mit Wasser und Ethanol gespült und bis zur Verwendung in Ethanol (96 %) aufbewahrt. Die Funktionalisierung der Glasträger erfolgte mit einer Mischung aus Linker und dem entsprechenden Lösungsmittel (Volumenverhältnis: 4:1) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Als Linker wurden 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES; 98 %, ABCR), 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS; 97 %, Sigma) und 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan (MPTMS, 95 %, ABCR) verwendet. Als Lösungsmittel für die Silanisierung mit APTES wurde Wasser verwendet, für APTMS und MPTMS Methanol. Nach der Funktionalisierung wurden die Träger für 15 Minuten mit dem entsprechenden Lösungsmittel gewaschen, um ungebundene Linkermoleküle zu entfernen. Zur Festigung der Bindung zwischen Linker und Glas wurden die Träger zunächst bei Raumtemperatur und anschließend bei 120°C für jeweils 10 Minuten getrocknet. Die abgekühlten Träger wurden dann für 24 h in der jeweiligen Nanopartikellösung inkubiert und abschließend noch einmal mit Wasser gewaschen, um ungebundene Nanopartikel zu entfernen. Die fertigen Substrate wurden in Wasser gelagert.

Für die Funktionalisierung der Glasoberflächen mit MPTMS wurde noch eine weitere Funktionalisierungsmethode, vorgeschlagen von Goss et al.<sup>[49]</sup> verwendet. Dazu wurden die sauberen Glassubstrate in einer Mischung von 40 ml 2-Propanol, 1 ml MPTMS und 1 ml Wasser für 10 Minuten gekocht. Anschließend wurden die Substrate mit 2-Propanol gewaschen und bei 110°C für 8 Minuten getrocknet. Diese Prozedur wurde dreimal durchgeführt. Nach der letzten Trocknung wurde die Substrate erneut mit 2-Propanol und Wasser gewaschen und anschließend 24 h in der Nanopartikellösung inkubiert.

### **3.3 Herstellung von Oberflächen mit Nanopartikelmischungen**

Die Herstellung gemischter Gold- und Silbernanopartikeloberflächen erfolgte mit APTES analog zur Herstellung der reinen Gold- und Silbersubstrate wie in 3.2 beschrieben. Für die Inkubation mit den Nanopartikeln wurde jeweils eine Mischung von Goldnanopartikellösung und unterschiedlich hergestellten Silbernanopartikellösungen in den in Tabelle 3-1 aufgelisteten Volumenverhältnissen verwendet.



Tabelle 3-1: Mischungsverhältnisse (Volumina der jeweiligen Nanopartikellösungen und Partikelanzahl) für die Herstellung gemischter Gold-Silber-Nanopartikeloberflächen. Abkürzungen: Au(c): Citrat-reduzierte Goldnanopartikel, Ag(c): Citrat-reduzierte Silbernanopartikel, Ag(h): Hydroxylamin-reduzierte Silbernanopartikel.

Nanopartikel	Volumenverhältnis	Mischungsverhältnis (Partikelanzahl)
Au(c), Ag(c)	1:1	~ 10:1
Au(c), Ag(h)	1:3	~ 1:3
Au(c), Ag(h)	1:1	~ 1:1
Au(c), Ag(h)	3:1	~ 3:1

Bei der Herstellung gemischter Gold-Silber-Substrate mit *p*-Aminothiophenol (PATP) wurden zunächst Goldnanopartikel mit APTES immobilisiert. Anschließend wurden die Nanopartikel durch Inkubation in  $10^{-5}$  M bzw.  $10^{-6}$  M wässriger PATP-Lösung für 1 h funktionalisiert. Nach Abwaschen der ungebundenen PATP-Moleküle mit Wasser wurden die Substrate für 24 h in einer Lösung von Citrat-reduzierten Silbernanopartikeln inkubiert. Im Anschluss wurden ungebundene Silbernanopartikel durch Waschen mit Wasser entfernt.

Für die Herstellung der gemischten Gold-Platin-Substrate wurden Glasoberflächen mit APTES funktionalisiert und anschließend in einer Mischung von Gold- und Platinnanopartikeln (mit einem Partikelverhältnis von 1:1) für 24 h inkubiert.

### 3.4 Herstellung von SERS-Substraten mittels Elektronenstrahlolithographie

Die Arbeiten mit Elektronenstrahlolithographie (*electron beam lithography*, EBL) wurden im Labor von Dr. Kristjan Leosson, (University of Iceland, Reykjavik, Island) an einem Rasterelektronenmikroskop (Leo Supra 25, Zeiss) mit einem EBL-Zusatz (Raith) mit einer Beschleunigungsspannung von 10 keV durchgeführt. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Abbildung 3-1 schematisch dargestellt. Als Substrate wurden Siliziumwafer verwendet, die in einigen Fällen einer thermischen Oxidation unterzogen wurden, um einen ca. 100 nm dicken Siliziumdioxidfilm zu erzeugen. Auf die Siliziumwafer wurde im zweiten Schritt eine Doppelschicht aus Polymethylmethacrylat (PMMA) aufgebracht, in der mittels EBL das gewünschte Muster erzeugt wurde. Das Muster legt die Form und den Abstand zwischen den Partikeln fest. Anschließend wird zunächst eine dünne (ca. 2 nm dicke) Chromschicht und darüber eine Schicht von Gold (99,99 %) auf dem Polymer mittels Elektronenstrahl abgeschieden. Die Chromschicht dient dem besseren Haften des Goldes auf den Siliziumdioxidoberflächen.

Im letzten Schritt, dem sogenannten „lift-off“, wird das noch vorhandene Polymer und damit die Metallschicht, die sich auf dem Polymer befindet, in Aceton gelöst.

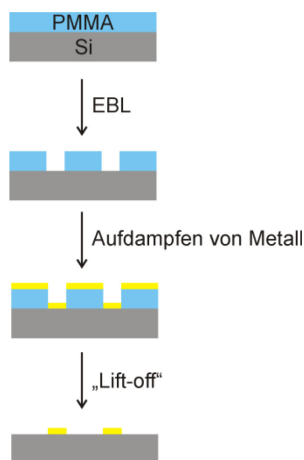


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte bei der Herstellung von nanostrukturierten Oberflächen mit Elektronenstrahlithographie (EBL).

Durch die Streuung von Elektronen innerhalb der im Herstellungsprozess verwendeten Polymermatrix und an dem darunter befindlichen Siliziumwafer, kommt es zu einer Aufweitung des Primärstrahls<sup>[119]</sup>. Dadurch ist der Bereich, der vom Elektronenstrahl beeinflusst wird, größer als die Breite des Elektronenstrahls und der Abstand zwischen den Partikeln auf ein Minimum von 65 nm beschränkt.

Um den Abstand der Nanostrukturen zu verringern, wurden zunächst Nanostrukturen wie oben beschrieben mit einer Höhe von ca. 30 nm auf den Siliziumwafern hergestellt. Anschließend wurden auf diese Substrate durch Gleichstrom-Magnetron-Sputtern mehrmals dünne Goldschichten (2-6 nm) aufgetragen und nach jeder Auftragung auf ca. 500°C erhitzt. Das Erhitzen hat zur Folge, dass das aufgebrachte Gold zu kleinen Inseln zusammenläuft bzw. sich an den bereits vorhandenen Nanostrukturen anlagert.

### 3.5 Charakterisierung der plasmonischen und morphologischen Eigenschaften der Nanopartikel in Lösung und auf Oberflächen

Die UV/Vis-Spektren aller Proben wurden mit einem UV/Vis-NIR Doppelstrahlspektrophotometer (V-670, Jasco) in einem Wellenlängenbereich von 300 bis 1000 nm aufgenommen. Die Messungen der Nanopartikel in Lösung erfolgten in Quartz-Küvetten mit 1 cm Weglänge in den in Tabelle 3-2 zusammengefassten Verdünnungen. Für die Messung der Substrate wurde ein spezieller Probenhalter zur Messung flächiger Proben verwendet.

Tabelle 3-2: Verdünnung der Nanopartikellösungen in den Extinktionsmessungen. Probenbezeichnungen: AuNPX, Gold-Nanopartikel, AgNPX, Silbernanopartikel.

Bezeichnung	Verdünnung
AuNP1	unverdünnt
AuNP2	unverdünnt
AuNP3	unverdünnt
AgNP1	1:2
AgNP2	1:5
AgNP3	1:5
AgNP4	1:5
AgNP5	1:2

*Bestimmung des Zeta-Potentials.* Für die Zeta-Potentialmessungen wurde ein Zetasizer (Malvern Instruments) verwendet. Die Temperatur während der Messung betrug 25°C. Die Proben wurden vor dem Beginn der Messungen jeweils für 2 Minuten equilibriert. Es wurden PMMA-Küvetten verwendet. Die Nanopartikellösungen wurden in einem Volumenverhältnis von 1:5 mit Wasser verdünnt. Pro Probe wurden drei Messreihen mit je 30 Messungen aufgenommen. Die Bestimmung des Zeta-Potentials aus den Änderungen der Streuintensitäten erfolgte mit Hilfe des Modells von Smoluchowski<sup>[108]</sup>.

*Röntgenkleinwinkelstreuung (small angle X-ray scattering, SAXS).* Die Röntgenkleinwinkelstreuungsmessungen wurden mit einer Kratky-Kamera SAXSess (Anton Paar, Österreich) durchgeführt. Das Gerät wurde mit einer gläsernen Feinfokus Röntgenröhre bei 40 kV und 50 mA ( $\text{CuK}\alpha$ ,  $\lambda = 0.1542 \text{ nm}$ ) betrieben. Eine fokussierende Multischichtoptik und ein Blockkollimator lieferten einen monochromatischen Primärstrahl mit einem geringen Hintergrund. Die SAXS-Daten (Intensität als Funktion des Streuvektors  $q$ ) wurden für 2 Minuten mit einem CCD-Detektionssystem in einem  $q$ -Bereich von  $0,08$  bis  $6,0 \text{ nm}^{-1}$  aufgenommen. Für alle Messungen wurde eine wiederverwendbare Kapillare benutzt, um ein konstantes Streuvolumen und den gleichen Beitrag zum Hintergrundsignal zu gewährleisten. Die erhaltenen Streukurven wurden hinsichtlich des Beitrags des Lösungsmittels (Wasser) und der Glaskapillare korrigiert. Weiterhin wurden die Daten unter Verwendung des Längenprofils des Primärstrahls mit Hilfe der Software SAXSQuant (Anton Paar) entschmiert. An die Streukurven wurde eine Modellfunktion angepasst, in der die Partikel in der Probe als harte Kugeln mit einer Schultz-Zimm Größenverteilung angenommen werden.

*Bildgebende Verfahren.* Die Transmissionselektronenmikroskopieaufnahmen wurden mit einem Tecnai G<sup>2</sup> 20 S-TWIN (FEI, Hillsboro, USA) aufgenommen. Die Elektronen

wurden mit einer LaB<sub>6</sub>-Kathode erzeugt, die Beschleunigungsspannung betrug 200 keV. Für die Messung wurde ein Tropfen der jeweiligen Nanopartikellösung vor der Messung auf einem Kupfergitter eingetrocknet, das mit Kohlenstoff beschichtet war.

Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen wurden mit einem Hitachi S-4000 mit kalter Feldemissionskathode als Anregungsquelle aufgenommen. Die Beschleunigungsspannung betrug je nach Probe 15 kV oder 20 kV. Zur Erhöhung der Leitfähigkeit wurden die Substrate vor der Untersuchung mit Kohlenstoff bedampft.

Rasterkraftmikroskopieaufnahmen wurden im Nicht-Kontakt-Modus unter Umgebungsbedingungen an einem NanoWizard 2 (JPK Instruments AG, Deutschland) durchgeführt. Für die Messungen wurde ein Cantilever aus Silizium (Olympus Corporation, Japan) mit einer typischen Resonanzfrequenz von 70 kHz und einer Federkonstanten von ungefähr  $2 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$  verwendet. Es wurden Höhen-, Phasen-, und Amplitudenbilder aufgenommen. Die statistische Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe der Software SPIP (Image Metrology A/S, Denmark).

Rastertunnelmikroskopiemessungen wurden mit einem Rastertunnelmikroskop der Firma Molecular Imaging (Tempe, USA) mit einer Wolframspitze ( $\varnothing$  0.25 mm) durchgeführt. Die Spitze wurde durch elektrochemisches Ätzen eines Wolframdrahtes in einer 1 M Kaliumhydroxidlösung hergestellt.

### **3.6 Raman-Experimente**

Für die Raman-Messungen wurde ein Raman-Mikroskop (LabRamHR, Horiba Jobin-Yvon) verwendet. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 3-2 dargestellt.

Zur Anregung wurde entweder eine Aluminium:Galliumarsenid-Laserdiode ( $\lambda = 785 \text{ nm}$ ) oder ein Helium-Neon-Laser ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) verwendet. Die Laserintensität wurde jeweils durch verschiedene Neutraldichtefilter abgeschwächt. Die Fokussierung des Laserstrahls auf der Probe und die Sammlung des von der Probe rückgestreuten Lichts erfolgten mit Hilfe eines Mikroskopobjektivs.

Das Mikroskop verfügt über drei Objektive mit unterschiedlichen Vergrößerungen (10x, 50x und 100x, Olympus) für die Messung fester Proben und ein Wasserimmersionsobjektiv (60x, Olympus) für Messungen in Flüssigkeiten. Der Durchmesser der

Messfläche auf der Probe beträgt bei Verwendung des 60x- Objektivs ca.  $1,5 \mu\text{m}$ . Das Fokusbild im Tropfen wird auf ca.  $10^{-14} \text{ l}$  abgeschätzt.

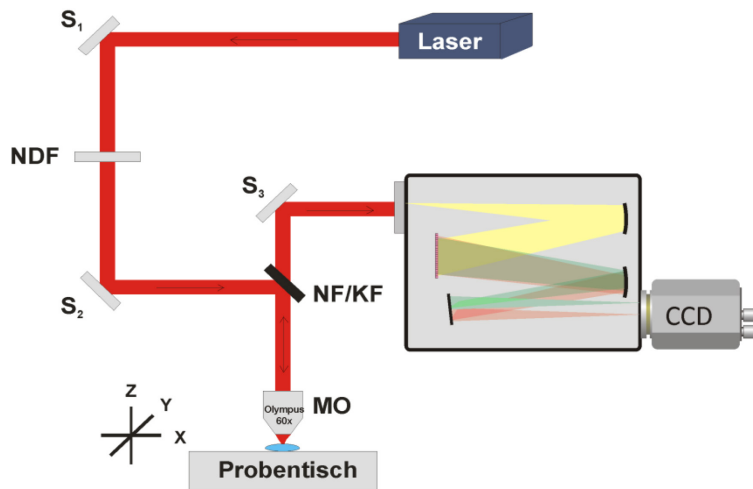


Abbildung 3-2: Schematischer Aufbau des verwendeten Raman-Mikroskops bestehend aus: Laser, Spiegeln (S), Neutraleichtfilter (NDF), Mikroskopobjektiv (MO), positionierbarer Probentisch mit Probe, Notch-Filter/Kantenfilter (NF/KF), Spektrometer und CCD-Detektor.

Die Position der Probe kann durch einen computergesteuerten Probentisch genau eingestellt werden. Je nach Anregungswellenlänge filtert ein Notch- bzw. Kantenfilter das von der Probe elastisch gestreute Rayleigh-Licht heraus. Für die Messungen in dieser Arbeit wurde stets ein Gitter mit  $300 \text{ l}\cdot\text{mm}^{-1}$  verwendet, die Kollimatorlänge betrug  $800 \text{ mm}$ . Damit werden mittlere spektrale Auflösungen von  $1,7 \text{ cm}^{-1}$  für eine Anregungswellenlänge von  $785 \text{ nm}$  und von  $2,6 \text{ cm}^{-1}$  für eine Anregungswellenlänge von  $633 \text{ nm}$  erreicht. Beim Detektor handelt es sich um eine stickstoffgekühlte CCD-Kamera. Es erfolgte eine Frequenzkalibrierung auf die Linie bei  $520 \text{ cm}^{-1}$  im Spektrum einer Siliziumprobe.

### 3.7 Bestimmung der SERS-Verstärkungsfaktoren

Die Abschätzung des Verstärkungsfaktors erfolgte anhand der Intensitäten von ausgewählten Banden in Mittelwertspektren aus einem SERS-Experiment ( $I_{\text{SERS}}$ ) und einem normalen Raman-Experiment ( $I_{\text{RS}}$ ) unter Einbeziehung der unterschiedlichen Anzahl Moleküle, die zur Intensität im normalen Raman-Experiment ( $N_{\text{RS}}$ ) und im SERS-Experiment beitragen ( $N_{\text{SERS}}$ ) nach folgendem Zusammenhang:

$$EF = \frac{I_{SERS} \cdot N_{RS}}{I_{RS} \cdot N_{SERS}} \quad (27)$$

Für die Abschätzung der Verstärkungsfaktoren wurden die Spektren von Kristallviolett (CV) sowie von Adenin in wässriger Lösung verwendet.

Da für Adenin kein normales Raman-Spektrum in wässriger Lösung erhalten werden kann, wurde in diesem Fall als Raman-Intensität  $I_{RS}$  die Intensität der Bande von Methanol verwendet. Für Adenin wurde die Intensität der Ringatemschwingungsbande bei  $734\text{ cm}^{-1}$ , für Methanol die Intensität der Bande bei  $1020\text{ cm}^{-1}$  und für CV die Intensität der C-C-Biegeschwingung der Bande bei  $1134\text{ cm}^{-1}$  und der Ringatemschwingungsbande bei  $1620\text{ cm}^{-1}$  bestimmt.

*Abschätzung der Bedeckung der Nanopartikeloberflächen.* Zur Abschätzung der Bedeckung der Nanopartikeloberflächen wurde zunächst aus dem, mittels TEM bestimmten, Partikeldurchmesser und der Partikelkonzentration (Abschnitt 3.1), unter Annahme einer kugelförmigen Geometrie, die Gesamtoberfläche der Nanopartikel pro Volumeneinheit bestimmt. Der Platzbedarf eines Analytmoleküls auf der Oberfläche wurde der Literatur entnommen: Adenin:  $0,42\text{ nm}^2$  (Ref.<sup>[120]</sup>), CV:  $4\text{ nm}^2$  (Ref.<sup>[121]</sup>), PATP:  $0,19\text{ nm}^2$  (Ref.<sup>[122]</sup>) und 6-MP:  $0,28\text{ nm}^2$  (Ref.<sup>[123]</sup>).

### **3.8 Probenpräparation und Vorgehensweise in den Experimenten zur Bestimmung der SERS-Verstärkungsfaktoren.**

*Nanopartikel in Lösung.* Für die Bestimmung der SERS-Aktivität der Nanopartikel in Lösung wurden jeweils  $20\text{ }\mu\text{l}$  der Nanopartikellösung mit  $2\text{ }\mu\text{l}$   $100\text{ mM}$  Natriumchloridlösung (99,99 %, Merck) sowie  $2\text{ }\mu\text{l}$  Analytlösung versetzt. Die Konzentrationen der Lösungen von Kristallviolett (CV, > 90 %, J.T. Baker) und Adenin (99 %, Fluka) betrugen  $5 \cdot 10^{-6}\text{ M}$  für CV bzw.  $1 \cdot 10^{-5}\text{ M}$  für Adenin in den Messungen mit Goldnanopartikeln. In den Experimenten mit Silbernanopartikeln wurden  $1 \cdot 10^{-6}\text{ M}$  CV bzw.  $5 \cdot 10^{-6}\text{ M}$  Adenin eingesetzt. Für die Bestimmung des Verstärkungsfaktors unter Verwendung von Adenin wurden der Lösung zusätzlich  $10\text{ }\mu\text{l}$  Methanol beigelegt, welches auch in Anwesenheit von SERS-aktiven Substraten in jedem Fall ein normales Raman-Spektrum liefert. Im Fall von CV wurden die normalen Raman-Spektren zur Ermittlung des Verstärkungsfaktors mit einer  $10^{-4}\text{ M}$  CV-Lösung aufgenommen.

Die Messungen mit CV wurden bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm (Laserintensität:  $I = 8,5 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) und die Messungen mit Adenin bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm (Laserintensität:  $I = 4,8 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) durchgeführt. Die Akkumulationszeit betrug in allen Fällen 1 s. Es wurden jeweils mehrere Serien von jeweils 30 Spektren aufgenommen, die dann für die Bestimmung der Verstärkungsfaktoren gemittelt wurden.

*Immobilisierte Nanopartikel.* Die Bestimmung der SERS-Aktivität der immobilisierten Nanopartikel erfolgte ausschließlich anhand der Spektren von CV. Dazu wurden 10  $\mu\text{l}$  einer  $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  CV-Lösung auf die Substrate gegeben und auf einer Fläche von  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  (Abstand zwischen den Punkten: 10  $\mu\text{m}$ ) SERS-Spektren aufgenommen. Die Laserintensität betrug  $8,5 \cdot 10^3 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$  und die Akkumulationszeit 1 s.

*Größenabhängigkeit der SERS-Verstärkung.* Für die Bestimmung der Größenabhängigkeit des elektromagnetischen Beitrags zur SERS-Verstärkung von Goldnanopartikeln definierter Größe wurden je 20  $\mu\text{l}$  der Lösungen mit Goldnanopartikeln (Radien von 7,5 nm bis 20 nm, siehe Kapitel 3.1) mit 2  $\mu\text{l}$   $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  CV versetzt. Von diesen Lösungen wurden dann Spektren gemessen, die Intensitäten der Banden bei  $1134 \text{ cm}^{-1}$  und  $1620 \text{ cm}^{-1}$  ausgelesen und jeweils über 100 Spektren gemittelt und der Verstärkungsfaktor nach Gleichung 27 bestimmt. Die normalen Raman-Spektren von CV wurden mit einer  $10^{-4} \text{ M}$  Lösung aufgenommen. Im Fall der immobilisierten Nanopartikel wurden je 10  $\mu\text{l}$  CV im Konzentrationsbereich von  $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  bis  $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  auf die Oberfläche gegeben, auf einer Fläche von  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  im Abstand von 10  $\mu\text{m}$  Spektren aufgenommen und die Intensitäten auf jeder Fläche gemittelt. Für alle Experimente wurde eine Anregungswellenlänge von 633 nm und eine Integrationszeit von 1 s verwendet. Die Laserintensität betrug  $8,5 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$  bei den Messungen mit Nanopartikeln in Lösung und  $8,5 \cdot 10^3 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$  bei den Messungen mit immobilisierten Nanopartikeln.

### 3.9 FDTD-Berechnungen der Intensität des lokalen Feldes von plasmonischen Nanostrukturen

Für die Berechnung der Feldintensität wurde die Software FDTD Solutions (Lumerical Computational Solutions, Vancouver, Kanada) verwendet, mit der man elektrodynamische Simulationen mittels finiter Differenzen-Methode (*finite difference time domain*, FDTD) vornehmen kann.

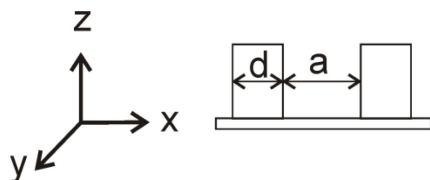


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung eines Zylinderdimers mit Durchmesser  $d$  und Abstand  $a$  und zugehörigem Koordinatensystem in den FDTD-Simulationen.

Als Anregungsquelle wurde eine ebene Welle mit Ausbreitung in  $z$ -Richtung und Polarisation in  $x$ -Richtung und einer Wellenlänge von 633 nm gewählt, diese entspricht den Bedingungen in den parallel durchgeführten Experiment (Abbildung 3-3). Die Anregungsintensität wurde so gewählt, dass die Intensität des Anregungsfeldes 1 ist, sodass die in der Berechnung erhaltenen Feldintensitäten der Feldverstärkung entsprechen. Die wellenlängenabhängige Dielektrizitätskonstante von Gold wurde Ref.<sup>[92]</sup> entnommen. Die Größe der Yee-Zellen (siehe Abschnitt 2.6) in der Nähe der Nanopartikel wurde auf 1 bzw. 2 nm gesetzt, je nach Abstand zwischen den Nanostrukturen. Für die Begrenzung des Simulationsraums wurden 12 *perfectly matched layers* (PML) verwendet.

### 3.10 Bestimmung der Reaktionskonstanten verschiedener Katalysatoren

Goldsubstrate, hergestellt nach der in Abschnitt 3.2 beschriebenen Methode mit APTES als Linker, wurden in 4 ml einer Mischung von  $10^{-4}$  M Nitrothiophenol und  $10^{-4}$  M 2-Naphtalenthiole für 1 Stunde funktionalisiert und anschließend mit Wasser gewaschen. Für die Messung wurde ein Tropfen von 20  $\mu$ l einer Mischung aus Natriumborhydridlösung ( $10^{-2}$  M) und Katalysator auf die Substrate gegeben. Als Katalysatoren wurden Kupfer(II)-acetylacetonat (Sigma-Aldrich,  $\leq 99,99\%$ ), Nickel (II)-acetylacetonat (Sigma-Aldrich, 95 %) und Platinnanopartikel verwendet. Die Konzentrationen der Katalysatoren betrugen 0.054  $\mu$ M ( $3 \cdot 10^{16}$  Partikel  $\cdot$  l $^{-1}$ ) für die Platinnanopartikel, 0,5 g  $\cdot$  l $^{-1}$  für das Kupfer(II)-acetylacetonat und das Nickel-(II)-acetylacetonat.

Es wurden auch Messungen mit immobilisierten Platinnanopartikeln, welche gemeinsam mit den plasmonischen Goldnanopartikeln auf den Oberflächen vorlagen (siehe Abschnitt 3.3), durchgeführt. Die Oberflächen wurden ebenfalls in 4 ml einer Mischung von  $10^{-4}$  M *p*-Nitrothiophenol (PNTp) und  $10^{-4}$  M 2-Naphtalenthiole (2-NT) für 1 Stunde funktionalisiert und anschließend mit Wasser gewaschen. Für die Messungen wurde im Gegensatz zu den Messungen mit Goldsubstraten nur ein Tropfen  $10^{-2}$  M Natriumborhydridlösung ohne Zugabe eines zusätzlichen Katalysators auf die Substratoberfläche



gegeben. Unter Verwendung eines Wasserimmersionsobjektivs wurden alle 2 Sekunden Spektren für 1 s aufgenommen ( $\lambda = 785 \text{ nm}$ ,  $I = 4,8 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ).

Aus den Spektren wurden die Intensitäten der Signale bei  $599 \text{ cm}^{-1}$  von 2-NaphtalenthioI und  $724 \text{ cm}^{-1}$  von *p*-Nitrothiophenol (PNTp) zu jedem Zeitpunkt ermittelt, zueinander ins Verhältnis gesetzt und daraus die relativen Konzentrationen von PNTp  $[PNTp]$  ermittelt. Da Natriumborhydrid im Überschuss zugegeben wurde, wurde eine Kinetik pseudo-erster Ordnung angenommen<sup>[124,125,126]</sup> und die Reaktionskonstanten wie folgt bestimmt:

$$\ln \left( \frac{[PNTp]_0}{[PNTp]_t} \right) = kt \quad (28)$$

Bei Auftragung des natürlichen Logarithmus gegen die Zeit ergibt sich eine Gerade, deren Steigung mittels linearer Regression bestimmt werden kann. Die Linearität und die Anwendbarkeit einer Kinetik pseudo-erster Ordnung wurde mit dem Linearitätstest nach Mandel<sup>[127]</sup> überprüft. Die Grundlage dieses Tests ist die Annahme, dass die Abweichungen der Messwerte von der Kalibriergeraden von einer Nichtlinearität herrühren und durch Wahl eines passenderen Regressionsmodells, d.h. einer Funktion 2. Grades, signifikant verbessert werden können. Für diesen Test werden die Daten mit einer Kalibrierfunktion 1. Grades und einer Kalibrierfunktion 2. Grades angepasst und die jeweiligen, zugehörigen Reststandardabweichungen ( $s_{y1}$  und  $s_{y2}$ ) berechnet. Aus den Reststandardabweichungen wird die Differenz der Varianzen  $DS^2$

$$DS^2 = (N - 2)s_{y1}^2 - (N - 3)s_{y2}^2 \quad (29)$$

und daraus der Prüfwert PW für den F-Test

$$PW = \frac{DS^2}{s_{y2}^2} \quad (30)$$

berechnet, wobei N die Anzahl der Messpunkte ist.

Ist der Prüfwert kleiner als der Tabellenwert F ( $f_1 = 1$ ,  $f_2 = N-3$ ,  $P = 99 \%$ ), wird durch die Kalibrierfunktion 2. Grades keine signifikant bessere Anpassung erreicht und der Verlauf der Messwerte kann als linear angenommen werden.

Parallel wurden die katalysierten Reaktionen auch anhand von Extinktionsmessungen beobachtet. Die UV/Vis-Messungen wurden mit einem UV/Vis-NIR Doppelstrahlspektrophotometer (V-670, Jasco) in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 600 nm in Quartz-Küvetten mit 1 cm Weglänge aufgenommen. Dafür wurden 500  $\mu\text{l}$   $10^{-4}$  M Nitrothiophenollösung mit 50  $\mu\text{l}$  0,1 M Natriumborhydridlösung und dem jeweiligen Katalysator versetzt. Die Katalysatorkonzentrationen entsprachen denen in den SERS-Experimenten. Über einen Zeitraum von 60 Minuten wurde jede Minute ein Spektrum aufgenommen und die Intensität der Bande bei 408 nm des Nitrothiophenols ermittelt. Da Natriumborhydrid im Überschuss hinzugefügt wurde, konnte auch hier eine Kinetik pseudo-erster Ordnung angenommen werden und die Bestimmung der Reaktionskonstanten aus den Daten erfolgte nach Gleichung 28 analog zur Auswertung der SERS-Daten.

### 3.11 SERS-Experimente mit Norepinephrin

Für die Messung von Norepinephrin wurden Silbersubstrate verwendet, die durch Immobilisierung von Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln (AgNP3, siehe 3.1) mit APTES hergestellt wurden. Die Funktionalisierung der Substrate mit Cysteamin ( $\geq 98\%$ , Sigma) erfolgte durch einstündige Inkubation in 20 mM Cysteaminlösung. Für die Funktionalisierung der Substrate mit Glutaraldehyd (Grade I, 25 %, Sigma) wurden diese für 16 h in einer dreiprozentigen Glutaraldehydlösung in 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 8,2) inkubiert. Nach der Funktionalisierung wurden die Substrate jeweils mit Wasser bzw. Phosphatpuffer gewaschen, um überschüssiges Funktionalisierungsreagenz zu entfernen. Die Anbindung des Norepinephrins (97 %, Sigma) an die Glutaraldehydfunktionalisierten Substrate erfolgte durch Inkubation der Substrate in einer Norepinephrinlösung in 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 8,2) für eine Stunde. Die Konzentration der Norepinephrinlösung wurde dabei über den Bereich von  $10^{-4}$  M –  $10^{-7}$  M variiert.

Die SERS-Messungen wurden mit dem Wasserimmersionsobjektiv bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm durchgeführt, indem ein Tropfen einer 0,1 M Phosphatpufferlösung auf das Substrat gegeben wurde und jeweils auf einer Fläche von  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  (Abstand zwischen den Messpunkten: 10  $\mu\text{m}$ ) Spektren aufgenommen wurden. Die Laserintensität betrug  $4,8 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$  und die Integrationszeit 1 s.

### 3.12 SERS-Experimente mit wässrigen Extrakten von Pollen

Wässrige Pollenextrakte verschiedener Arten, *Populus nigra* ‘Italica’ (Schwarzpappel), *Secale cereale* (Roggen), *Betula occidentalis* (Wasserbirke), *Artemisia tridentata* (Wüstensalbei) (alle Sigma), wurden durch Überschichten einer kleinen Menge der jeweiligen Pollenkörner (ca. 0.5 mg) mit 100  $\mu\text{l}$  deionisiertem Wasser (18,2 M $\Omega$ ) für 10 Minuten und anschließender Zentrifugation erhalten.

Für SERS-Messungen mit Goldnanoaggregaten in Lösung wurden 2  $\mu\text{l}$  des Überstandes mit 20  $\mu\text{l}$  der Nanopartikellösung und 2  $\mu\text{l}$  100 mM Natriumchloridlösung gemischt. Von jeder Probe wurden 100 Spektren aufgenommen. Für Messungen auf den mit APTES immobilisierten Goldnanopartikeln wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  des Extraktes auf die Oberflächen gegeben. Anschließend wurden Spektren auf einer Fläche von 100 x 100  $\mu\text{m}$  gemessen (Abstand zwischen den Messpunkten: 10  $\mu\text{m}$ ). Die Spektren wurden bei einer Wellenlänge von 785 nm mit einer Laserintensität von  $2,4 \cdot 10^5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$  im Fall der Messungen mit Nanopartikeln in Lösung und  $4,8 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$  bei den Messungen mit immobilisierten Nanopartikeln verwendet. Die Integrationszeit betrug 1 s.

Nach der Messung wurden die 100 Spektren jedes Datensatzes gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Für die Clusteranalyse und die Hauptkomponentenanalyse wurden die gemittelten Spektren zudem einer Basislinienkorrektur und einer Vektornormierung unterzogen. Es wurden alle Datenpunkte im Spektralbereich von  $400 \text{ cm}^{-1} - 1700 \text{ cm}^{-1}$  einbezogen. Die Gruppierung der Spektren mittels Clusteranalyse erfolgte anhand der euklidischen Abstände (Gleichung 31) unter Verwendung des Ward-Algorithmus (Gleichung 32).

$$d(x, y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n |x_i - y_i|^2} \quad (31)$$

$$d^2(j, k) = \frac{n_j n_k}{(n_j + n_k)} \left\| \bar{x}_j - \bar{x}_k \right\|^2 \quad (32)$$

### 3.13 Bestimmung der Thiopurin-S-Methyltransferaseaktivität

Für die Bestimmung der Thiopurin-S-Methyltransferaseaktivität wurden mit APTES immobilisierte, Hydroxylamin-reduzierte Silbernanopartikel verwendet. Die Funktional-

lisierung der Substrate erfolgte durch Inkubation in 4 ml einer  $10^{-5}$  M 6-Mercaptopurinlösung (6-MP, 98 %, ABCR) für 1 h und anschließendes Waschen mit Wasser. Für die Kalibrierung wurden zudem Substrate mit  $10^{-5}$  M 6-Methylmercaptipurinlösung (6-MMP, 97 %, Alfa Aesar) sowie einer 1:1-Mischung (V/V) von 6-MP und 6-MMP (jeweils  $10^{-5}$  M) funktionalisiert. Für die Untersuchung der Enzymaktivität wurden zwei Ansätze präpariert. Im ersten Ansatz wurden die Substrate wie oben beschrieben mit 6-MP funktionalisiert und anschließend in 2 ml einer Mischung von 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), S-Adenosyl-L-methionin ( $10^{-4}$  M) und 6  $\mu\text{l}$  Thio-purin-S-Methyltransferase ( $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , ProSpec) für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen. Im zweiten Ansatz wurde die gleiche Mischung aus  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , S-Adenosylmethionin und Enzym wie im ersten Ansatz verwendet. Allerdings wurde das 6-MP (Endkonzentration:  $10^{-5}$  M) direkt zur Mischung gegeben und diese Mischung dann ebenfalls für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die Mischung für 1 h auf eine unfunktionalisierte Oberfläche mit Silbernanopartikeln gegeben. Nach der Funktionalisierung wurde mit Wasser gewaschen.

Die SERS-Messungen erfolgten in wässriger Lösung unter Verwendung eines Wasser-immersionsobjektivs unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 785 nm und einer Anregungsintensität von  $4,8\cdot 10^4 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Pro Substrat wurden auf einer Fläche von  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  xy-Scans mit einer Schrittweite von  $10 \mu\text{m}$  aufgenommen. Die Integrationszeit pro Messpunkt betrug 1 s. Anschließend wurden die Intensitäten der C-S-Streckschwingung bei  $434 \text{ cm}^{-1}$  und der Ringschwingung bei  $546 \text{ cm}^{-1}$  <sup>[128]</sup> bestimmt, gemittelt und zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Es wurde eine Probe für HPLC-MS-Untersuchungen nach dem Protokoll für den zweiten Ansatz (siehe oben) hergestellt. Für die HPLC-Trennung der Substanzen wurde ein Flüssigchromatograph (Agilent 1200) mit einer C-18-Ether-Trennsäule (Varian Polaris 3,  $150 \times 1 \text{ mm}$ ) und einer C-18-Vorsäule eingesetzt. Von jeder Probe wurde ein Volumen von 8  $\mu\text{l}$  injiziert und anschließend mit einer Mischung der Eluenten A (95% Wasser, 4,9 % Methanol, 0,1 % Ameisensäure (V/V/V)) und B (99,9 % Methanol, 0,1 % Ameisensäure (V/V)) und einer Flußrate von  $30 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  eluiert. Dabei wurde ein Lösungsmittelgradient (0 – 20 Minuten 0 – 20 % B) verwendet und abschließend mit 95 % des Eluenten B gewaschen. Die Detektion erfolgte über ein Massenspektrometer mit linearer Ionenfalle (LTQ, Thermo Scientific).

## 4. Gold und Silbernanopartikel als SERS-Substrate

Für die SERS-Spektroskopie werden vor allem Nanostrukturen aus Gold und Silber verwendet, da sie neben Kupfer die Metalle sind, deren Plasmonenbande im sichtbaren Spektralbereich liegen und damit eine Anregung mit sichtbarem Licht ermöglichen. Kupfernanostrukturen haben den Nachteil, dass sie sehr oxidationsempfindlich sind<sup>[129,130]</sup> und finden daher kaum Anwendung.

In diesem Abschnitt der Arbeit werden die plasmonischen und morphologischen Eigenschaften von Nanopartikeln in Lösung und deren Einfluss auf die Eigenschaften im SERS-Experiment diskutiert. Es ist bekannt, dass die Größe, Form, Oberflächenladung und Polydispersität von Gold- und Silbernanopartikeln von der Herstellungsmethode und den Reaktionsbedingungen (Temperatur, Konzentration des Reduktionsmittels, Art des Reduktionsmittels, Laserleistung, Laserwellenlänge und Bestrahlungszeit) abhängt<sup>[99,115,131,132]</sup>. Für die Herstellung von Gold- und Silbernanopartikeln gibt es zahlreiche Verfahren, wie z.B. Laserablation<sup>[133]</sup>, photochemische Reduktion<sup>[134]</sup> und chemische Reduktion. Die am häufigsten verwendete Methode ist die chemische Reduktion von Gold- bzw. Silbersalzen mit verschiedenen Reduktionsmitteln wie Natriumcitrat<sup>[24,113,114]</sup>, Natriumborhydrid<sup>[117]</sup>, Hydroxylamin<sup>[116]</sup> oder auch unter Verwendung von Polymerlösungen<sup>[135]</sup>. Während bei den durch chemische Reduktion hergestellten Nanopartikeln ein Überschuss an Reduktionsmittel verwendet wird, der durch Bildung einer elektrochemischen Doppelschicht auch zur Stabilisierung der Nanopartikel führt<sup>[136]</sup>, werden bei der Laserablation in der Regel keine stabilisierenden Reagenzien hinzugefügt. Die Stabilisierung der Nanopartikel erfolgt in diesem Fall durch Oxid und Hydroxidspezies, die sich während der Laserablation an der Oberfläche bilden<sup>[137,138]</sup>.

Für systematische Untersuchungen ist die Verwendung von Partikeln unterschiedlicher Größen und mit verschiedenen Oberflächeneigenschaften von Interesse.

#### 4.1 Plasmonische und morphologische Eigenschaften unterschiedlich hergestellter Gold- und Silbernanopartikel

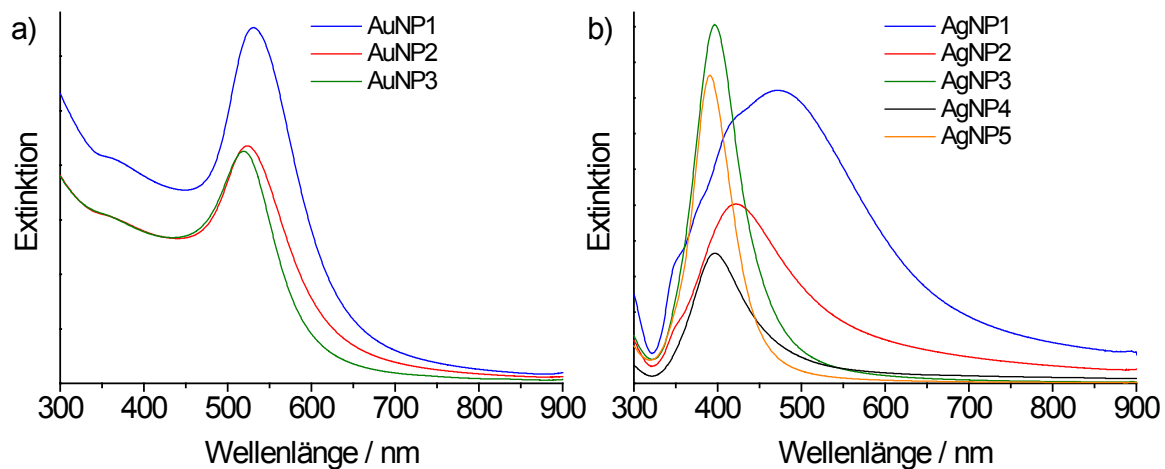


Abbildung 4-1: Extinktionsspektren der unterschiedlichen a) Gold- und b) Silbernanopartikel in Lösung.

Es wurden unterschiedliche Nanopartikel hergestellt. Dazu zählen Gold- und Silbernanopartikel, welche mit Bottom-Up-Verfahren, wie der Reduktion mit Natriumcitrat, Hydroxylamin und Natriumborhydrid, hergestellt wurden und auch Partikel, die mittels Laserablation, d.h. Top-Down-Methoden gewonnen wurden. Zunächst wurden die Partikel bezüglich ihrer plasmonischen und morphologischen Eigenschaften charakterisiert. In Abbildung 4-1 sind die Extinktionsspektren der Nanopartikel in Lösung gezeigt. Sie weisen die für Gold- und Silbernanopartikel typischen Plasmonenbanden mit Extinktionsmaxima bei ca. 520 nm für Gold (Abbildung 4-1 a) und ca. 400 nm für Silber (Abbildung 4-1 b) auf. Abbildung 4-2 enthält repräsentative TEM-Aufnahmen der meisten der hergestellten Nanopartikel und die jeweiligen Größenverteilungen. Die aus den TEM-Aufnahmen bestimmten Partikeldurchmesser und die Partikelkonzentrationen sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Wie Tabelle 4-1 zeigt, sind die Extinktionsmaxima der drei verschiedenen Nanopartikellösungen unterschiedlich, was nach der Mie-Theorie<sup>[69]</sup> auf unterschiedliche Größen der Nanopartikel schließen lässt. Der Vergleich der TEM-Aufnahmen in Abbildung 4-2, d und e und der zugehörigen Größenverteilungen bestätigt, dass die zu kleineren Wellenlängen verschobene Plasmonenbande bei Au-NP3 tatsächlich durch eine geringere Größe der Nanopartikel erklärt werden kann. Während beim AuNP1 die Partikel eine Größe von ca. 30 nm aufweisen (Abbildung 4-2 d und D), sind die Partikel beim Au-NP3 durchschnittlich 15 nm groß (Abbildung 4-2 e und E).

Tabelle 4-1: Extinktionsmaxima, Durchmesser, Partikelkonzentration und Verstärkungsfaktor verschiedener Gold- und Silbernanopartikel. Die Partikeldurchmesser  $d$  wurden aus TEM-Aufnahmen ermittelt. Die Partikelkonzentrationen wurden, wie in Abschnitt 3.5 erläutert, bestimmt. Die Bestimmung der Verstärkungsfaktoren (EF) erfolgte mit CV und für einige Nanopartikel auch mit Adenin/Methanol (Werte in Klammern).

Bezeichnung	Herstellung	$\lambda_{\max}$ [nm]	$d$ [nm]	Partikel- konzentration [Partikel·l <sup>-1</sup> ]	EF
Au-NP1	Reduktion mit Citrat <sup>[24]</sup>	531	$29 \pm 5$	$3 \cdot 10^{14}$	$4 \cdot 10^3$ ( $2 \cdot 10^7$ )
Au-NP2	Reduktion mit Citrat <sup>[113]</sup>	523	-	$7 \cdot 10^{14}$	$9 \cdot 10^2$
Au-NP3	Reduktion mit Citrat <sup>[114]</sup>	519	$16 \pm 3$	$6 \cdot 10^{15}$	$9 \cdot 10^1$
Ag-NP1	Reduktion mit Citrat <sup>[24]</sup>	469	$86 \pm 23$	$3 \cdot 10^{13}$	$1 \cdot 10^3$ ( $2 \cdot 10^6$ )
Ag-NP2	*Reduktion mit Hydroxylamin <sup>[116]</sup>	422	$53 \pm 22$	$1 \cdot 10^{14}$	$5 \cdot 10^3$ ( $5 \cdot 10^7$ )
Ag-NP3	*Reduktion mit Hydroxylamin <sup>[116]</sup>	397	-	$3 \cdot 10^{14}$	$9 \cdot 10^3$
Ag-NP4	Laserablation	396	$26 \pm 11$	$9 \cdot 10^{13}$	$3 \cdot 10^2$
Ag-NP5	Reduktion mit Natriumborhydrid <sup>[139]</sup>	388	-	$9 \cdot 10^{13}$	$1 \cdot 10^3$

\*Hierfür wurden die Reaktionsbedingungen leicht modifiziert (siehe Abschnitt 3.1).

Das Extinktionsmaximum der laserablatierten Silbernanopartikel (AgNP4) liegt bei 396 nm (Abbildung 4-1). Die Partikel sind überwiegend sphärisch mit einem mittleren Durchmesser von 20 nm (Abbildung 4-2 c und C). Die Extinktionsspektren der anderen Silbernanopartikel unterscheiden sich dagegen sehr stark, je nach Herstellungsmethode und Reaktionsbedingungen. Das Extinktionsspektrum der durch Citratreduktion hergestellte AgNP1 weist ein Maximum bei 469 nm und eine sehr breite Extinktionsbande auf, während die Banden der Nanopartikel von AgNP3 und AgNP5 (Reduktion mit Hydroxylamin bzw. Natriumborhydrid) schmal sind (Abbildung 4-1).

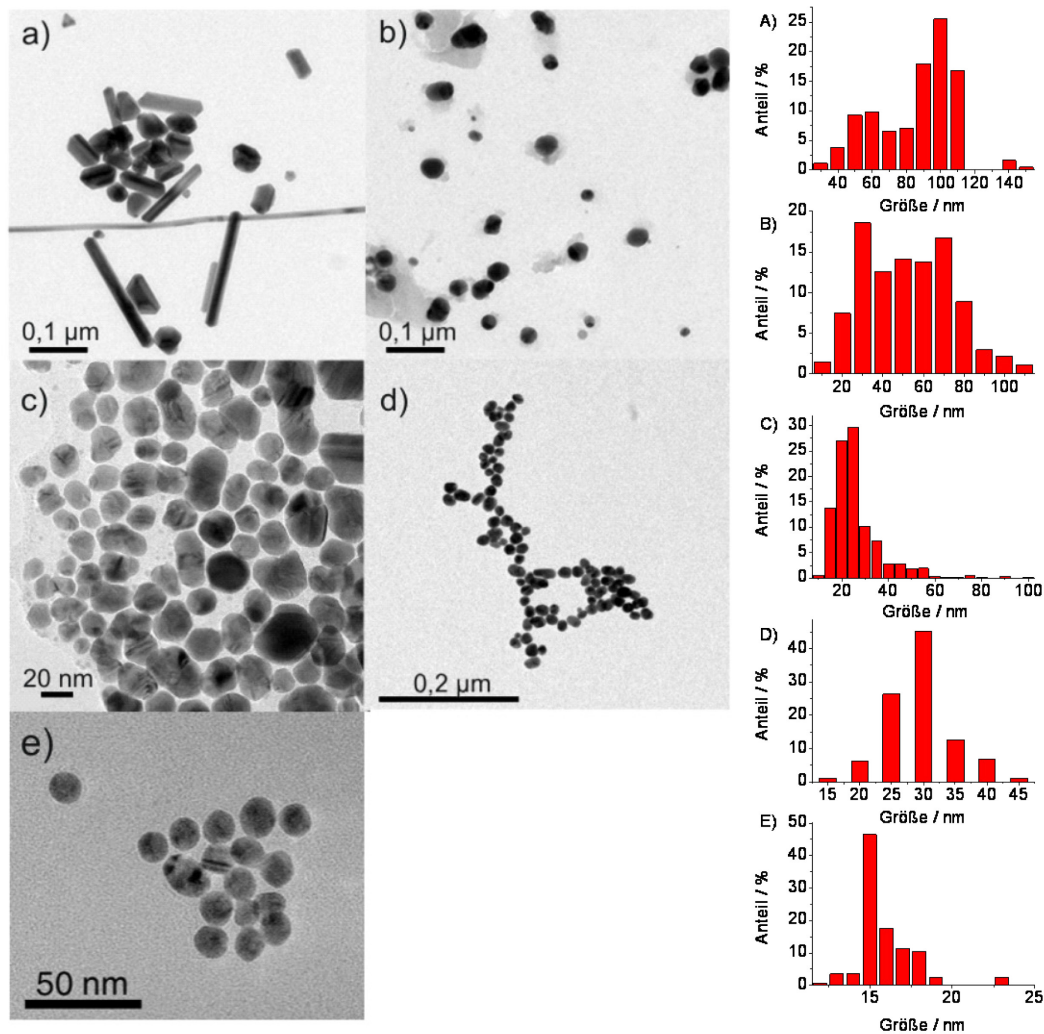


Abbildung 4-2: TEM-Aufnahmen von a) Citrat-reduzierten Silbernanopartikeln (AgNP1), b) Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln (AgNP2), c) laserablatierten Silbernanopartikeln (AgNP4) und d) Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln (AuNP1), e) Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln (AuNP3) und die daraus ermittelten Größenverteilungen (A-E, gleiche Reihenfolge).

Wie die TEM-Aufnahmen belegen, sind die Nanopartikel im AgNP1 (Citratreduktion) sehr groß und weisen vielfältige Formen auf (Abbildung 4-2 a und A), anders als die eher sphärischen Partikel in AgNP2 (Abbildung 4-2 b und B). Bei nicht-sphärischen Partikeln kommt es zum Einen zu unterschiedlichen Resonanzen in Abhängigkeit der Orientierung des Partikels zur Polarisationsrichtung des elektromagnetischen Feldes<sup>[140]</sup>. Zum Anderen können insbesondere in stäbchenförmigen Partikeln verschiedene plasmonische Moden beobachtet werden<sup>[141]</sup>. Beide Effekte führen zu einer Verbreiterung der Plasmonenbande. Die unterschiedliche Polydispersität der Nanopartikel lässt sich vermutlich auf unterschiedliche Bildungsgeschwindigkeiten zurückführen.



Die Reduktion mit Natriumborhydrid und Hydroxylamin finden bei Raumtemperatur statt und die Nanopartikelbildung verläuft sehr schnell. Die Reduktion mit Natriumcitrat erfordert ein Aufheizen der Lösung auf 100°C. Im Fall der Hydroxylaminreduktion, die unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurde, hängt die Breite der Extinktionsbande von der Reihenfolge der Zugabe der Reaktanden ab (Vergleich NP2 und NP3 in Abbildung 4-1 und Tabelle 4-1).

Die Polydispersität steht in direktem Zusammenhang mit der Möglichkeit, SERS-Substrate reproduzierbar herzustellen und reproduzierbare Verstärkungen im SERS-Experiment zu erhalten. Aufgrund der Abhängigkeit der SERS-Verstärkung von der Form und Größe der Nanostrukturen<sup>[5,142,143]</sup>, kann die Reproduzierbarkeit der SERS-Signale im Fall einer hohen Polydispersität der Nanopartikel geringer sein. Theoretische und experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass zwischen unterschiedlich großen Nanopartikeln, die in einer Kette angeordnet sind (sogenannte „Nanolinsen“) lokal besonders hohe elektromagnetische Felder und damit hohe SERS-Verstärkungen auftreten können<sup>[35,144,145]</sup>, wodurch eine hohe Polydispersität auch Vorteile haben kann. Für die Konstruktion flächiger SERS-Substrate in analytischen Fragestellungen sind jedoch reproduzierbare Signale und eine wiederholbare Herstellung bedeutsamer, als eine nicht reproduzierbare, nicht homogen verteilte, extrem hohe Verstärkung.

Die durch Aggregation beeinflussten plasmonischen Eigenschaften der Nanopartikel, welche einen zentralen Aspekt beim Verständnis der SERS-Verstärkung und dieser Arbeit darstellen, wurden in den folgenden Kapiteln ausführlicher untersucht (siehe Abschnitte 4.3, 5.1 und 5.3).

## **4.2 Verstärkungsfaktoren der Nanopartikel in Lösung**

Der Verstärkungsfaktor der unterschiedlichen Nanopartikel wurde sowohl mit Hilfe von Kristallviolett (CV) als auch für einige Nanopartikel mit Adenin und Methanol bestimmt. Adenin und CV sind bereits vielfach mit SERS untersucht worden<sup>[121,146,147,148,149,150]</sup>, sodass ihre Wechselwirkung mit der Metalloberfläche und die Orientierung auf der Metalloberfläche bekannt sind. CV hat gegenüber Adenin den Vorteil, dass bei präresonanter Anregung sowohl ein normales Raman- als auch ein SERS-Spektrum aufgenommen werden kann. Dadurch kann eine Überbestimmung des Verstärkungsfaktors aufgrund der unterschiedlichen Streuquerschnitte von Methanol und Adenin vermieden werden (siehe Kapitel 2.4).

Die Bestimmung der Verstärkungsfaktoren erfolgten anhand der Intensitäten der Ring-  
atemschwingungsbanden von Adenin<sup>[149]</sup> bei  $736\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 4-3 b) und CV<sup>[147]</sup> bei  
 $1620\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 4-3 b). Als Referenz für das normale Raman-Signal wurde im Falle  
des Adenins die Intensität der Methanolbande bei  $1020\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 4-3 a) ver-  
wendet.

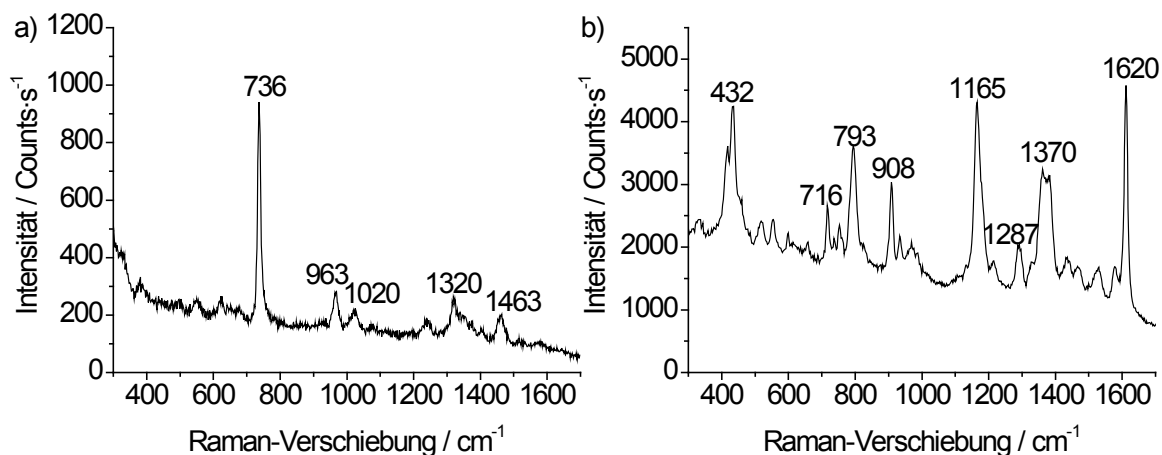


Abbildung 4-3: SERS-Spektren von a)  $5 \cdot 10^{-7}\text{ M}$  Adenin und  $8,2\text{ M}$  Methanol und b)  $5 \cdot 10^{-7}\text{ M}$  CV auf Citrat-reduzierten Goldnanoaggregaten (a)  $\lambda = 785\text{ nm}$ ,  $I = 8 \cdot 10^4\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,  $1\text{ s}$  und b)  $\lambda = 633\text{ nm}$ ,  $I = 2,7 \cdot 10^4\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,  $1\text{ s}$ ).

Die Verstärkungsfaktoren sind in der letzten Spalten von Tabelle 4-1 aufgelistet. Bei der Bestimmung mit CV zeigen die Nanopartikel Verstärkungsfaktoren zwischen  $10^2$  und  $10^4$  auf, wobei die Citrat-reduzierten Goldnanopartikel, die nach der Methode von Horisberger<sup>[114]</sup> hergestellt wurden (AuNP3), und die laserablatierten Silbernanopartikel (AgNP4) die kleinsten Verstärkungsfaktoren aufweisen (Tabelle 4-1). Die mit Adenin/Methanol erhaltenen Verstärkungsfaktoren sind um ca. drei Größenordnungen höher. Dies illustriert deutlich, wie bereits in Kapitel 2.4 diskutiert, dass der Verstärkungsfaktor vom gewählten System abhängt. Die mit Adenin/Methanol bestimmten Verstärkungsfaktoren (Tabelle 4-1) stimmen gut mit den in der Literatur beschriebenen Verstärkungsfaktoren für Gold- und Silbernanopartikel in Lösung von  $10^6 - 10^8$  überein<sup>[88,151]</sup>. Vergleicht man die Verstärkungsfaktoren der hergestellten Nanopartikel untereinander, so erkennt man, dass sie für Gold und Silber sehr ähnlich sind, aber von der Herstellungsmethode und den Reaktionsbedingungen abhängen. Bei den Goldnanopartikeln nimmt der Verstärkungsfaktor mit zunehmender Citratmenge beim Herstellungsprozess ab.

Das kann zum Einen durch ein unterschiedliches Aggregationsverhalten und zum Anderen durch eine verschlechterte Zugänglichkeit der Oberfläche für das Analytmolekül, aufgrund stärkerer Bedeckung mit Citrationen, erklärt werden.

Bei den Silbernanopartikeln erhält man für die, durch chemische Reduktion hergestellten, Partikel sehr ähnliche Verstärkungsfaktoren (Tabelle 4-1). Die mittels Laserablation hergestellten Partikel weisen hingegen einen niedrigeren Verstärkungsfaktor auf. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Cañamares et al.<sup>[152]</sup> beim Vergleich der SERS-Aktivität unterschiedlich hergestellter Silbernanopartikel erhalten. Sie begründeten die niedrige SERS-Aktivität der laserablatierten Silbernanopartikel mit einer geringeren Stabilität der Nanopartikel aufgrund fehlender Oberflächenladung. Es ist jedoch bekannt, dass sich auf der Oberfläche von laserablatierten Nanopartikeln Oxid- und Hydroxidspezies befinden, die die Nanopartikel stabilisieren<sup>104, 105</sup>. Zeta-Potenzialmessungen mit den Nanopartikeln von AgNP4 (Tabelle 4-1) bestätigen, dass die Oberfläche der Partikel negativ geladen ist. Das Zeta-Potenzial ist mit  $-44 \pm 2$  mV ähnlich groß, wie das der chemisch reduzierten Silbernanopartikel (AgNP1:  $-36 \pm 2$  mV und AgNP2:  $-32 \pm 1$  mV). Dies bedeutet, dass die geringe SERS-Aktivität nicht durch eine geringere Oberflächenladung begründet werden kann. Die laserablatierten Nanopartikel sind mit einem Durchmesser von 26 nm deutlich kleiner als die chemisch reduzierten Nanopartikel (siehe Abbildung 4-2 mit zugehörigen Größenverteilungen). Neben einem geänderten Aggregationsverhalten, welches in Abschnitt 5.1 noch diskutiert werden wird, könnte also die geringere Größe den Unterschied in der Verstärkung erklären.

#### **4.3 Untersuchung der Größenabhängigkeit der SERS-Verstärkung von Goldnanopartikeln in Lösung**

Wie aus den Ergebnissen der beiden vorherigen Abschnitte hervorgeht, können die Oberflächeneigenschaften und die Größe der Nanopartikel einen Einfluss auf die SERS-Verstärkung haben. Durch gezielte Untersuchungen zum Wachstum von Goldnanopartikeln mittels SAXS und XANES ist es der Gruppe von F. Emmerling gelungen, eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, Goldnanopartikel definierter Größe und mit geringer Polydispersität unter Verwendung von Natriumcitrat herzustellen<sup>[104]</sup>. Damit konnte erstmalig die Größenabhängigkeit des elektromagnetischen Beitrags zur SERS-Verstärkung von Goldnanopartikeln in Lösung im Experiment bestimmt werden. Die Ergebnisse werden in diesem Abschnitt der Arbeit diskutiert.

Bisher war die Herstellung monodisperser Nanopartikel definierter Größe nur unter Verwendung eines weiteren Stabilisierungsreagenzes, wie z.B. 2-Mercaptobernsteinsäure oder Ascorbinsäure möglich<sup>[153,154,155]</sup>, wodurch die Oberflächeneigenschaften für verschiedene Größen variieren.

Kenntnisse über den Zusammenhang des Beitrags der elektromagnetischen Verstärkung zur Gesamtverstärkung im SERS-Experiment in Abhängigkeit der Nanopartikelgröße sind für die Entwicklung neuer und reproduzierbarer SERS-Substrate wichtig. Zu diesem Thema gibt es bereits zahlreiche theoretische<sup>[5,16,57,140,156]</sup>, sowie einige experimentelle<sup>[17,157,158]</sup> Arbeiten. Die meisten der experimentellen Arbeiten wurden jedoch an Nanopartikelarrays durchgeführt. Untersuchungen auf Arrays haben den Nachteil, dass neben dem Einfluss durch die Größe auch Wechselwirkungen zwischen den Partikeln, die durch die Nähe der Partikel zueinander in solchen Arrays zustande kommen, eine Rolle für die Verteilung des lokalen Feldes spielen<sup>[71,159,160,161,162]</sup>. Zudem werden viele SERS-Untersuchungen in Lösung durchgeführt, weshalb es von Interesse ist, die Größenabhängigkeit des elektromagnetischen Beitrags zur Verstärkung im SERS-Experiment mit Nanopartikeln in Lösung zu untersuchen.

Für die Untersuchungen wurden Goldnanopartikel mit Radien von 7,5 nm, 10 nm, 12,5 nm, 15 nm, 17,5 nm und 20 nm verwendet, die nach der in der Arbeitsgruppe von F. Emmerling<sup>[104]</sup> entwickelten Methode durch Aufwachsen auf monodispersen Goldnanopartikeln von 7,5 nm Radius hergestellt wurden. Sowohl für die Synthese der Seed-Partikel als auch für den Aufwuchsprozess wird dabei ausschließlich Natriumcitrat als Reduktionsmittel verwendet, sodass die Oberflächeneigenschaften der Nanopartikel unterschiedlicher Größe sehr ähnlich sind. Identische Oberflächeneigenschaften sind eine wesentliche Voraussetzung, um eine spezifische Wechselwirkung des Moleküls mit der Oberfläche als Ursache für eine geänderte SERS-Verstärkung auszuschließen und so den elektromagnetischen Beitrag zur SERS-Verstärkung untersuchen zu können.

Durch die Wechselwirkung von Analyt und Metalloberfläche wird sowohl die chemische Verstärkung als auch die Anzahl an Molekülen, die am SERS-Prozess teilnehmen beeinflusst. Je stärker die Oberfläche von stabilisierenden Ionen besetzt ist und je stärker die Wechselwirkung zwischen den Ionen und der Metalloberfläche ist, desto weniger Analytmoleküle können binden.

Wie bereits erwähnt, spielt die Kopplung der Felder von Nanopartikeln für die Verteilung der Felder eine wesentliche Rolle. Soll nun die Verstärkung eines einzelnen, freien Partikels im Experiment betrachtet werden, muss das Experiment unter Bedingungen durchgeführt werden, in denen keine Aggregation der Partikel stattfinden kann. Es muss also ein Analytmolekül gefunden werden, welches bei Zugabe zur Nanopartikellösung nicht zu einer Aggregation der Nanopartikel führt, da sonst neben der Größe weitere Einflüsse, wie Ausmaß der Aggregation und Morphologie der Aggregate, eine Rolle spielen<sup>[36]</sup>.

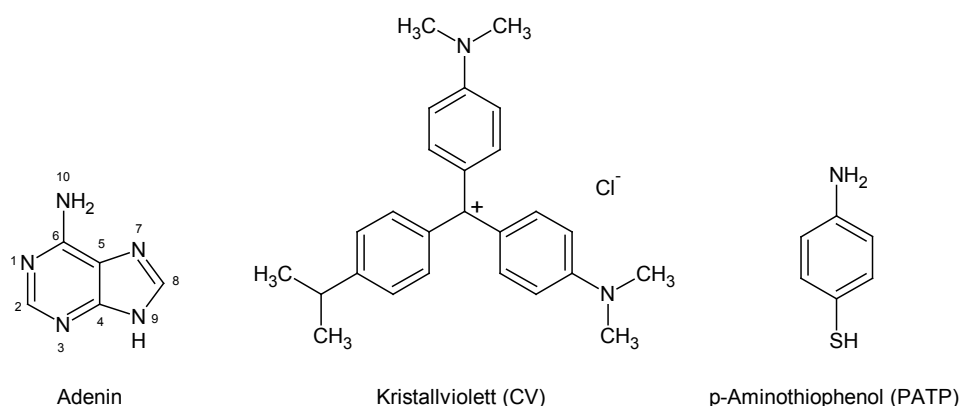


Abbildung 4-4: Strukturformeln von Adenin, Kristallviolett und *p*-Aminothiophenol.

Gleichzeitig sollte, wie im vorherigen Abschnitt 4.2 diskutiert eine Überbestimmung des Verstärkungsfaktors vermieden werden. Aus diesem Grund bietet sich auch hier ein Molekül an, für das unter ähnlichen experimentellen Bedingungen, d.h. in wässriger Lösung, sowohl ein normales Raman- als auch ein SERS-Spektrum aufgenommen werden kann. Um das wesentlichere der beiden Kriterien, nämlich keine Aggregation, zu erfüllen, wurden neben bereits im Abschnitt 4.2 durchgeführten Experimenten mit Kristallviolett (CV) auch Experimente mit Adenin und *p*-Aminothiophenol (PATP) (Abbildung 4-6) durchgeführt. Alle Moleküle sind bereits vielfach mit SERS untersucht worden<sup>[88,147,149,150,163,164]</sup> und weisen unterschiedliche Wechselwirkungsmechanismen mit der Metalloberfläche auf. Das PATP bindet kovalent über die Thiogruppe an die Metalloberfläche<sup>[163]</sup>, während beim Adenin die Wechselwirkung über den Purinstickstoff (N7, Abbildung 4-4) und die exozyklische Aminogruppe stattfindet<sup>[150]</sup>. Die Wechselwirkung zwischen CV und der Metalloberfläche findet vermutlich durch die Pyridinstickstoffe statt und ist nur schwach<sup>[147]</sup>.

Diese schwache Wechselwirkung von CV mit der Metalloberfläche und der damit zu erwartende geringe Beitrag der chemischen Verstärkung lassen CV besonders geeignet für die Experimente erscheinen. Es wurden nun Untersuchungen durchgeführt, um sicher zu stellen, dass die SERS-Experimente an einzelnen, isolierten Nanopartikeln stattfanden. Die Eigenschaften der Nanopartikel sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst. Die Polydispersität und die Größe der Nanopartikel wurden mit Röntgenkleinwinkelstreuung und Transmissionselektronenmikroskopie bestimmt. Die Nanopartikel weisen eine sehr kleine Polydispersität von 12 % auf, sodass sie gut geeignet sind, die Abhängigkeit der SERS-Verstärkung von der Größe der Nanopartikel zu untersuchen. Abbildung 4-5 zeigt Extinktionsspektren der Nanopartikel mit verschiedenen Radien. Das Extinktionsmaximum der Nanopartikel nimmt mit zunehmender Größe zu (Abbildung 4-5 a), was in guter Übereinstimmung mit der Theorie und vorherigen Arbeiten ist<sup>[91,93,165,166]</sup>.

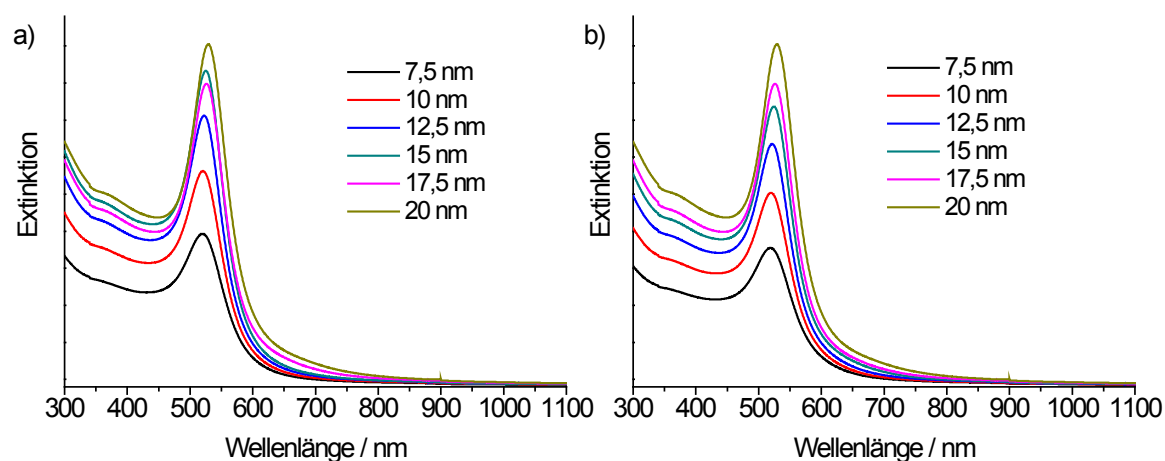


Abbildung 4-5: Extinktionsspektren von monodispersen, Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln mit einem Radius von 7,5 nm bis 20 nm a) vor und b) nach Zugabe von  $5 \cdot 10^{-6}$  M CV.

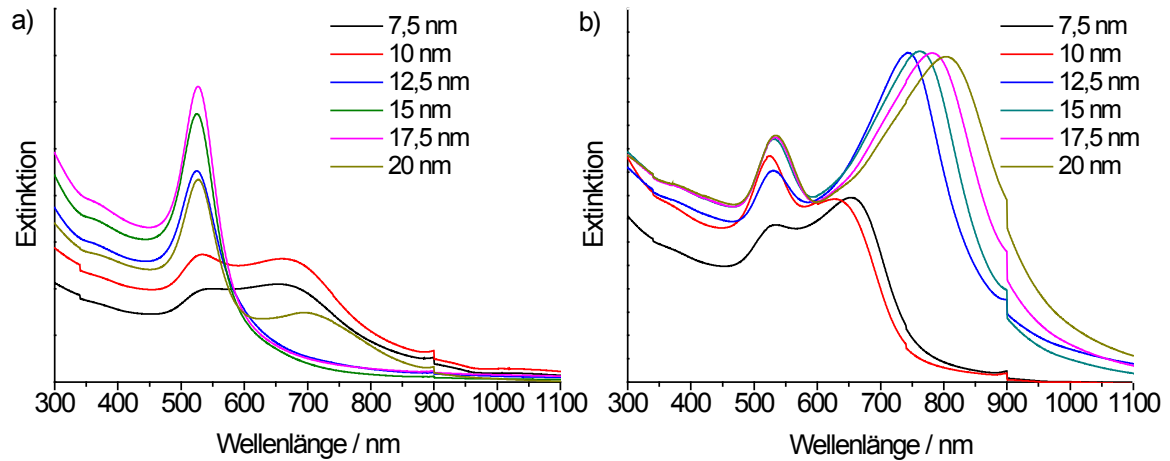


Abbildung 4-6: Extinktionsspektren von monodispersen, Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln mit einem Radius von 7,5 nm bis 20 nm nach Zugabe von a)  $10^{-4}$  M PATP und b)  $10^{-5}$  M Adenin.

Aufgrund der Synthesebedingungen nimmt die Nanopartikelkonzentration mit zunehmender Größe ab (Tabelle 4-2). Es wurde eine Konzentration gewählt, bei der eine vollständige Bedeckung der Oberfläche erreicht war, um eine mögliche Erhöhung des SERS-Signals lediglich durch eine höhere Anzahl an Molekülen auf der Nanopartikeloberfläche auszuschließen.

Tabelle 4-2: Extinktionsmaxima  $\lambda_{\max}$ , Partikelkonzentrationen und Bedeckungsgrad der Partikel mit Analyt bei Zugabe von  $5 \cdot 10^{-6}$  M CV,  $5 \cdot 10^{-5}$  M Adenin und  $10^{-4}$  M PATP für monodisperse Citrat-reduzierte Goldnanopartikel mit einem Radius von 7,5 nm bis 20 nm. Die Partikelkonzentrationen und der Bedeckungsgrad wurden wie in Abschnitt 3.1 und 3.7 erläutert, bestimmt.

Radius [nm]	$\lambda_{\max}$ [nm]	Partikel- konzentration [Partikel / Liter]	Oberfläche aller Partikel / Volumen [nm <sup>2</sup> / Liter]	Oberflächenbedeckung mit Analyt		
				CV	Adenin	PATP
7,5	$520 \pm 1,5$	$1,4 \cdot 10^{15}$	$1,0 \cdot 10^{19}$	118 %	124 %	112 %
10	$521 \pm 1,5$	$8,6 \cdot 10^{14}$	$1,1 \cdot 10^{19}$	112 %	143 %	129 %
12,5	$523 \pm 1,5$	$5,1 \cdot 10^{14}$	$1,0 \cdot 10^{19}$	120 %	132 %	119 %
15	$526 \pm 1,5$	$3,2 \cdot 10^{14}$	$9,1 \cdot 10^{18}$	133 %	147 %	133 %
17,5	$527 \pm 1,5$	$2,1 \cdot 10^{14}$	$8,1 \cdot 10^{18}$	149 %	163 %	147 %
20	$529 \pm 1,5$	$1,4 \cdot 10^{14}$	$7,3 \cdot 10^{18}$	166 %	173 %	156 %

Nach Abschätzung der Partikeloberflächen (Tabelle 4-2) aus den über SAXS ermittelten Größen und der Partikelkonzentration, lässt sich eine vollständige Bedeckung mit CV bei einer Konzentration von  $5 \cdot 10^{-6}$  M, mit Adenin bei einer Konzentration von  $5 \cdot 10^{-5}$  M und mit PATP bei einer Konzentration von  $1 \cdot 10^{-4}$  M erreichen (Tabelle 4-2).

Abbildung 4-7 zeigt die im Experiment mit CV ermittelten Verstärkungsfaktoren in Abhängigkeit vom Partikelradius. Es wird eine Zunahme des Verstärkungsfaktors mit steigendem Partikelradius von ca. 40 für die Partikel mit einem Radius von 7,5 nm bis 3400 für die Partikel mit 20 nm Radius beobachtet (Abbildung 4-7, Tabelle 4-3). Die Werte stimmen gut mit den bisherigen theoretischen Arbeiten überein, in denen für isolierte Nanopartikel Verstärkungen von 100-1000 vorhergesagt wurden<sup>[5]</sup>. Ergebnisse, die mit immobilisierten Goldnanopartikeln unterschiedlicher Größe erzielt wurden, zeigten Verstärkungsfaktoren von 400 für 20 nm große Partikel bis 2000 für 40 nm große Partikel<sup>[158]</sup>, was ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den hier bestimmten Verstärkungsfaktoren für isolierte Nanopartikel in Lösung ist.

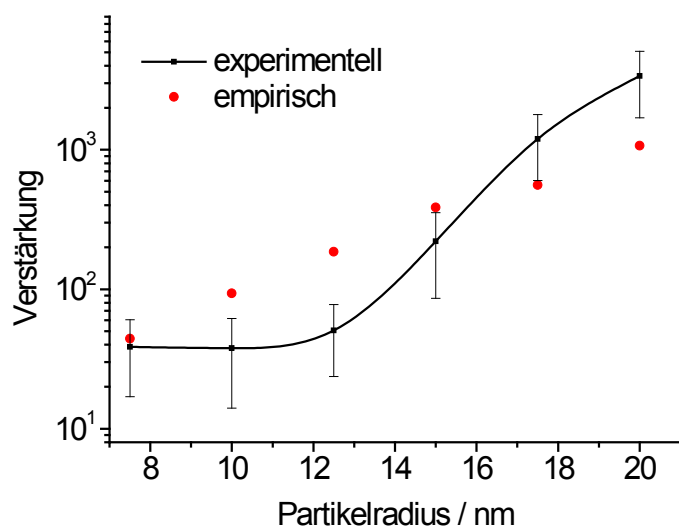


Abbildung 4-7: Verstärkungsfaktoren der unterschiedlich großen Goldnanopartikel aus dem SERS-Experiment (schwarze Quadrate) und elektromagnetische Verstärkung ermittelt aus den UV/Vis-Spektren nach Gleichung 33 (rote Kreise) in Abhängigkeit von der Nanopartikelgröße. Die Bestimmung der Verstärkungsfaktoren erfolgte mit  $5 \cdot 10^{-6}$  M CV ( $\lambda = 633$  nm, Intensität:  $2,7 \cdot 10^4$  W·cm<sup>-2</sup>, 1 s). Die Verstärkungsfaktoren, die aus den UV/Vis-Daten ermittelt wurden, wurden skaliert, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen.



Tabelle 4-3: Verstärkungsfaktoren der Goldnanopartikel mit unterschiedlichen Partikelradien aus dem SERS-Experiment.

Partikelradius	EF
7,5 nm	$39 \pm 22$
10 nm	$38 \pm 24$
12,5 nm	$51 \pm 27$
15 nm	$220 \pm 130$
17,5 nm	$1200 \pm 590$
20 nm	$3400 \pm 1700$

Wie bereits in Abschnitt 2.2 erläutert, setzt sich die Verstärkung aus mehreren Beiträgen zusammen, wobei der Beitrag der elektromagnetischen Verstärkung in der Regel am Größten ist.

Die Resonanzverstärkung hängt von den Eigenschaften des Moleküls und der gewählten Anregungswellenlänge ab und ist von den Eigenschaften der Nanopartikel unabhängig. Da die CV-Konzentration in allen Experimenten gleich war, trägt die Resonanzverstärkung von CV für alle Größen im gleichen Maß zur Verstärkung bei und die SERS-Verstärkung kann isoliert davon betrachtet werden.

Aus Messungen mittels TRG-Spektroskopie (*transient reflecting grating spectroscopy*) ist bekannt, dass bei Wechselwirkung von Kristallviolett mit einer Goldoberfläche ein Ladungstransfer vom Molekül zum Metall stattfindet<sup>[167]</sup>. Die dadurch entstehende chemische Verstärkung ist jedoch, ebenso wie die Resonanzverstärkung, unabhängig von der Größe der Nanopartikel, da sie auf einer Wechselwirkung des Analytmoleküls mit dem Metallnanopartikel beruht. Da der Beitrag der chemischen Verstärkung von der Symmetrie der betrachteten Molekülschwingung abhängen kann, wurde der Verstärkungsfaktor für zwei verschiedene Banden bestimmt, deren Schwingungen unterschiedliche Symmetrien aufweisen ( $1176\text{ cm}^{-1}$ : e-Symmetrie,  $1619\text{ cm}^{-1}$ : a<sub>1</sub>-Symmetrie, Abbildung 4-3)<sup>[147]</sup>.

Die in Abbildung 4-7 dargestellten Verstärkungsfaktoren sind für beide Schwingungen vergleichbar, d.h., dass für CV auf den Goldnanopartikeloberflächen die chemische Verstärkung unabhängig von der Symmetrie der Molekülschwingung ist.

Da sowohl die Resonanzverstärkung, als auch die chemische Verstärkung unabhängig von der Größe der Nanopartikel ist, kann die Zunahme der Verstärkung mit zunehmender Größe auf eine Erhöhung der elektromagnetischen Verstärkung zurückgeführt werden.

Diese beruht, wie bereits in Abschnitt 2.2 erläutert, auf einer Wechselwirkung der Oberflächenplasmonen mit dem Anregungsfeld. Aufgrund der Größenabhängigkeit der Dielektrizitätskonstanten von Metallnanopartikeln kommt es mit steigender Größe der Nanopartikel zu einer Verbreiterung der Plasmonenbande<sup>[86,168]</sup> (Abbildung 4-5), was zu einer erhöhten Extinktion im Bereich der Anregungswellenlänge (633 nm) führt. Die elektromagnetische Verstärkung kann über folgende empirisch ermittelte Gleichung<sup>[97]</sup> aus dem UV/Vis-Spektrum abgeschätzt werden:

$$G_{SERS} = \frac{1}{q^2 d^2} \frac{|\varepsilon(\omega_L)|^2 |\varepsilon(\omega_S)|^2}{\varepsilon''(\omega_L) \varepsilon''(\omega_S) \omega_L \omega_S} Abs_L Abs_S \quad (33)$$

Dabei ist  $q$  die Volumenfraktion an Gold,  $d$  die Absorptionsweglänge,  $\omega_L$  und  $\omega_S$  die Laser- und Stokeswellenzahl,  $\varepsilon_L$  und  $\varepsilon_S$  die dielektrischen Konstanten von Gold bei der jeweiligen Wellenlänge und  $Abs_L$  und  $Abs_S$  die Extinktionswerte bei der Laser und Stokeswellenlänge, die aus den UV/Vis-Spektren erhalten werden. Die so erhaltenen Verstärkungsfaktoren zeigen ebenfalls einen Anstieg mit zunehmender Größe der Nanopartikel (rote Kreise in Abbildung 4-7). Dies bestätigt, dass die Zunahme des Verstärkungsfaktors mit der Nanopartikelgröße auf einer Zunahme des elektromagnetischen Anteils an der Verstärkung beruht.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Verwendung von SERS-Substraten, vor allem bei quantitativen Messungen, ist die Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Analytkonzentration. Da die Anzahl der Moleküle, die zur Intensität der SERS-Signale beitragen in der Berechnung des Verstärkungsfaktors berücksichtigt wird (Gleichung 27 in Abschnitt 2.4), sollte dieser unabhängig von der Analytkonzentration sein, bis eine vollständige Bedeckung der Oberfläche erreicht ist. Für höhere Analytkonzentrationen wird eine Abnahme des Verstärkungsfaktors erwartet, weil die elektromagnetische Verstärkung mit  $d^{12}$  abnimmt, wobei  $d$  der Abstand von der Metallnanopartikeloberfläche ist. Die Moleküle, die sich weiter von der Partikeloberfläche befinden, erfahren eine geringere Verstärkung (Gleichung 9 in Abschnitt 2.2). Um die verschiedenen Einflüsse zu untersuchen, wurde der Verstärkungsfaktor in Abhängigkeit der Konzentration von Kristallviolett für drei verschiedene Größen (Radius: 7,5 nm, 15 nm und 20 nm) von Goldnanopartikeln bestimmt. Der Verstärkungsfaktor bleibt bis zu einer Konzentration von  $5 \cdot 10^{-6}$  M Kristallviolett für alle Größen innerhalb des Fehlers konstant (Abbildung 4-8). Diese Konzentration entspricht einer vollständigen Bedeckung der Oberfläche. Bei

weiterer Erhöhung der Konzentration nimmt der Verstärkungsfaktor für alle Größen zu (Abbildung 4-8). Dies kann durch eine Aggregation der Nanopartikel erklärt werden, die ab einer Konzentration von  $1 \cdot 10^{-5}$  M auch in den UV/Vis-Spektren anhand der Ausbildung einer erweiterten Plasmonenbande deutlich erkennbar ist (Abbildung 4-9). Zwischen aggregierten Nanopartikeln treten aufgrund der Wechselwirkung der elektromagnetischen Felder besonders hohe Feldverstärkungen auf<sup>[10,11]</sup>.

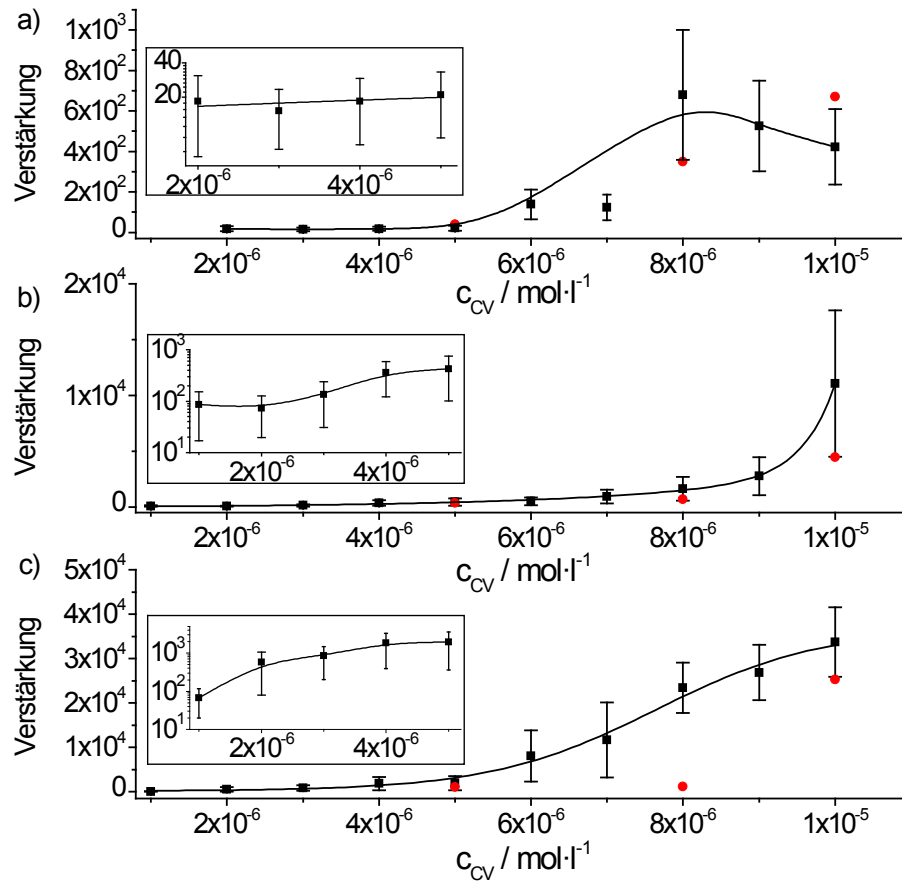


Abbildung 4-8: Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Konzentration an Kristallviolett für Goldnanopartikel mit einem Radius von a) 7,5 nm, b) 15 nm und c) 20 nm ermittelt aus dem SERS-Experiment ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ , Intensität:  $2,7 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 1 s) (schwarze Quadrate) und empirisch aus den UV/Vis-Spektren nach Gleichung 33 (rote Kreise). Die Verstärkungsfaktoren, die aus den UV/Vis-Daten ermittelt wurden, wurden skaliert, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen.

Für die Goldnanopartikel mit einem Radius von 7,5 nm nimmt die Verstärkung für hohe Analytkonzentrationen wieder ab (Abbildung 4-8 a). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die für den Analyten zugängliche Oberfläche aufgrund der Aggregation vermindert wird. Der Verlauf, der aus den UV/Vis-Spektren (Abbildung 4-9) bestimmten elektromagnetischen Verstärkung (rote Kreise, Abbildung 4-8), weicht vom Verlauf der experimentellen Werte ab. Besonders deutlich ist dies bei den Goldnanopartikeln mit

20 nm Radius zu beobachten (Abbildung 4-8 c). Dort erhält man bei einer CV-Konzentration von  $8 \cdot 10^{-6}$  M einen deutlichen Anstieg in der experimentell bestimmten Verstärkung, während der aus den UV/Vis-Spektren bestimmte Wert nahezu gleich dem bei  $5 \cdot 10^{-6}$  M CV ist. Das zeigt, dass Aggregate mit UV/Vis-Messungen nicht so empfindlich detektiert werden können, wie mit SERS-Messungen.

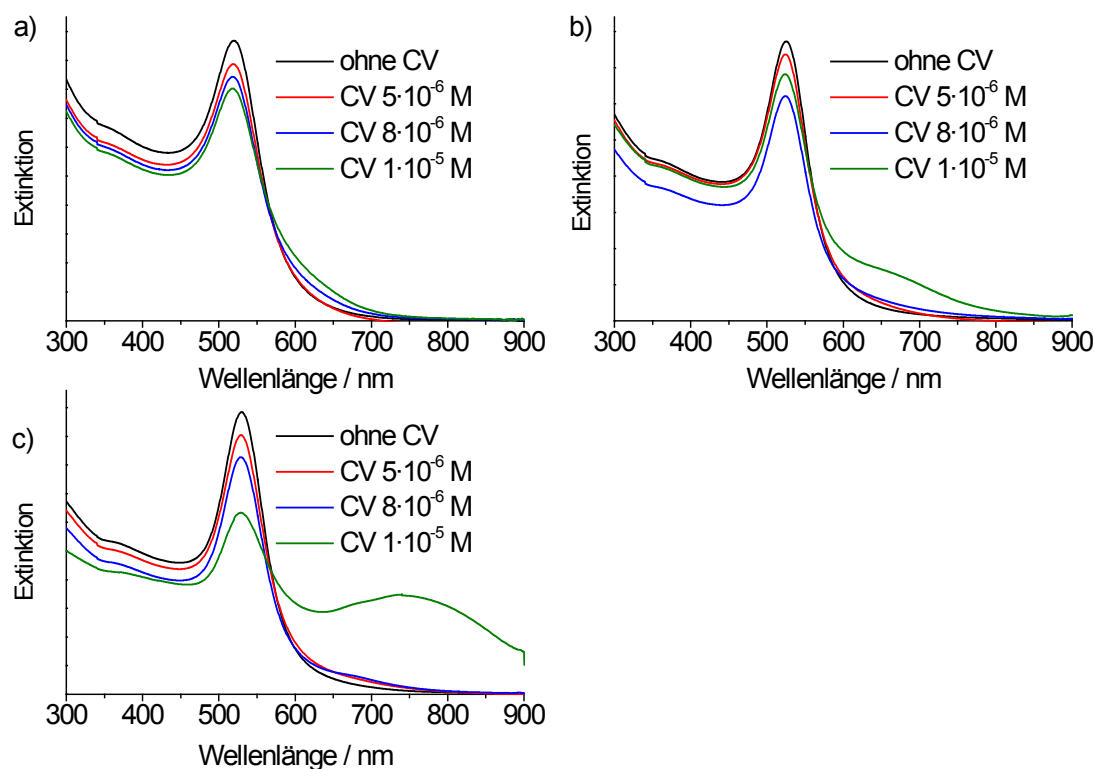


Abbildung 4-9: UV/Vis-Spektren von Goldnanopartikeln mit 7,5 nm, 15 nm und 20 nm Radius nach Zugabe von CV in unterschiedlichen Konzentrationen.

Unter Verwendung monodisperser Citrat-stabilsierter Goldnanopartikel definierter Größe und Kristallviolett als Analytmolekül, konnte die Abhängigkeit des elektromagnetischen Beitrags zur Verstärkung von Goldnanopartikeln im Größenbereich zwischen 15 nm und 40 nm experimentell bestimmt werden. Je größer die Goldnanopartikel, desto höher ist der elektromagnetische Beitrag zur Verstärkung. Dies ist in guter Übereinstimmung mit theoretischen Vorhersagen<sup>6, 17, 57, 134, 148</sup> und dem Trend der empirisch aus den Extinktionspektren ermittelten elektromagnetischen Verstärkung.

Ausgehend von einer kritischen Analytkonzentration, hat die Anwesenheit des Analytmoleküls einen Einfluss auf die Eigenschaften der Nanopartikel in Lösung aufgrund der Bildung von Aggregaten. Die Analytkonzentration, ab der eine Aggregation der Nanopartikel auftritt hängt neben den Eigenschaften des Analytmoleküls, auch von der Nano-

partikelgröße ab. Große Nanopartikel zeigen eine höhere Tendenz, Aggregate zu bilden. Die Bildung der Aggregate resultiert in einem Anstieg des Verstärkungsfaktors im SERS-Experiment. Die Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Analytkonzentration hat Folgen für die Anwendung von Nanopartikeln in Lösung in analytischen Fragestellungen, da es quantitative Messungen ohne internen Standard unmöglich macht.

## **5. Nanoskopische Eigenschaften gemischter SERS-Substrate in mikroskopischen Anwendungen von SERS**

Im letzten Kapitel wurde experimentell gezeigt, dass der Verstärkungsfaktor von Nanopartikeln verschiedener Größen in Lösung von der Analytkonzentration abhängig ist. Dies illustriert deutlich, dass ein Immobilisieren von Nanopartikeln bei dem analyt-induzierte Aggregation prinzipiell verhindert werden könnte und eine wichtige Strategie für die Anwendung von SERS in realen analytischen Fragestellungen ist<sup>[169,170,171,172]</sup>. Wie in der Einleitung beschrieben, soll in dieser Arbeit die Möglichkeit, Gold- und Silbernanopartikel auf Glasoberflächen mit Organosilanen anordnen zu können<sup>[51,55]</sup>, ausgenutzt werden. In diesem Abschnitt soll die Verstärkung im SERS-Experiment und ihre Variation auf mikroskopischem Niveau im Zusammenhang mit den nanoskopischen und plasmonischen Eigenschaften von organosilan-immobilisierten Nanopartikeln spezifiziert werden. Dazu wurden die Oberflächen mit Rasterkraftmikroskopie (SFM), Rasterelektronenmikroskopie (REM) und UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Dabei standen drei Parameter im Vordergrund, die von Interesse sind, wenn organosilan-immobilisierte Nanopartikeloberflächen als Substrate in mikroskopischen SERS-Experimenten eingesetzt werden sollen: (i) der Verstärkungsfaktor, (ii) die mikroskopische Homogenität der Verstärkung und (iii) die Stabilität der Verstärkung unter verschiedenen experimentellen Bedingungen, wie sie z.B. in bioanalytischen Fragestellungen auftreten.

### **5.1 Plasmonische und nanoskopische Eigenschaften immobilisierter Nanopartikelsubstrate**

Die Untersuchung der plasmonischen und morphologischen Eigenschaften verschieden hergestellter Gold- und Silbernanopartikel im Abschnitt 4.1 haben gezeigt, dass die Eigenschaften der Nanopartikel von der Präparationsmethode abhängen. Für die Herstellung der flächigen SERS-Substrate mittels Immobilisierung mit Organosilanen wurden Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel und verschiedene Silbernanopartikel, die über chemische Reduktion mit Natriumcitrat und Hydroxylamin und über Laserablation hergestellt wurden, verwendet.

Neben den Eigenschaften der Nanopartikel hängt die Anordnung der Nanopartikel auf den Glasoberflächen, wie in der Einleitung diskutiert, auch vom verwendeten Organosilan

und weiteren experimentellen Parametern, wie der Wahl des Lösungsmittels<sup>[51,52]</sup>, Funktionalisierungszeiten und Trocknung<sup>[53]</sup> ab, sodass auch mehrere Lagen von Nanopartikeln gebildet werden können<sup>[51,105]</sup>.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Organosilane als Linker verwendet: 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan (MPTMS, X = SH und R = CH<sub>3</sub> in Abbildung 5-1), 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS, X = NH<sub>2</sub> und R = CH<sub>3</sub> in Abbildung 5-1) und 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES, X = NH<sub>2</sub> und R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> in Abbildung 5-1). Um eine unspezifische Bindung auszuschließen, wurden zusätzlich Experimente mit Propyltrimethoxysilan (PTMS, X = H und R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> in Abbildung 5-1) durchgeführt.

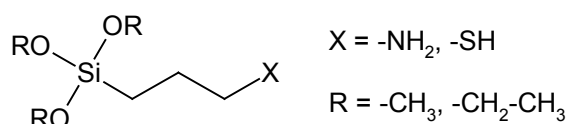


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung des Linkermoleküls.

In Abbildung 5-2 sind Extinktionsspektren von Citrat-stabilisierten Goldnanopartikelsubstraten dargestellt, die durch Immobilisierung mit MPTMS, APTMS und PTMS hergestellt wurden. Bei Verwendung von APTMS weisen die Spektren eine für Goldnanopartikel typische Plasmonenbande mit einem Extinktionsmaximum bei 522 nm auf (grünes Spektrum in Abbildung 5-2). Daraus kann geschlossen werden, dass sich Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel mit APTMS immobilisieren lassen. Bei Verwendung von PTMS und MPTMS tritt keine Extinktion im Bereich der Plasmonenbande von Goldnanopartikeln (Abbildung 5-2) auf. Das weist darauf hin, dass keine Goldnanopartikel gebunden wurden. Mercaptoverbindungen werden häufig für die Funktionalisierung von Goldoberflächen eingesetzt und bilden dabei stabile Monolagen<sup>[173,174,175]</sup>, die auf eine starke Wechselwirkung zwischen Gold und der Mercaptogruppe hinweisen. Deshalb sollten Goldnanopartikel an Mercatosilan-funktionalisierte Glasoberflächen binden. In XPS-Messungen an Glasoberflächen nach Funktionalisierung mit MPTMS konnten keine Schwefel-Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Das lässt vermuten, dass keine Funktionalisierung der Oberflächen mit MPTMS stattgefunden hat.

Auch bei Verwendung anderer in der Literatur beschriebener Methoden zur Silanisierung von Glasoberflächen mit MPTMS<sup>[49,176]</sup>, war es nicht möglich, die Oberflächen mit

MPTMS zu funktionalisieren. Es ist bekannt, dass bei MPTMS Selbst-Polymerisation auftritt<sup>[177]</sup>, die vermutlich schneller abläuft als die Reaktion mit den SiOH-Gruppen in der Glasoberfläche. Die Ergebnisse bestätigen, dass für die Anbindung der Nanopartikel ein Linkermolekül benötigt wird und keine unspezifische Bindung stattfindet.

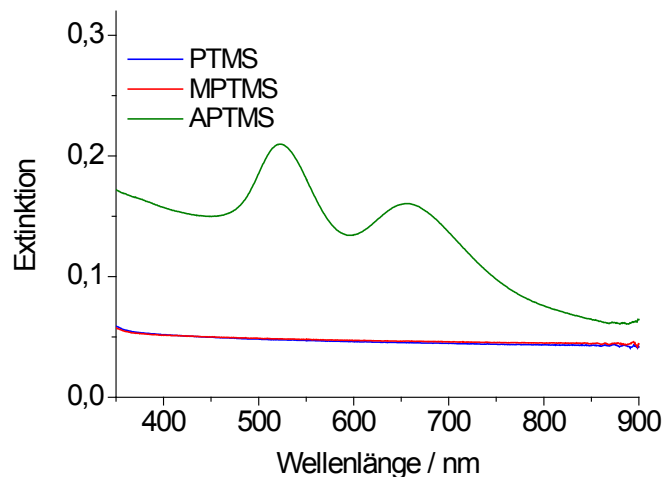


Abbildung 5-2: Extinktionsspektren von Citrat-stabilisierten Goldnanopartikel (Ref.<sup>[24]</sup>), die mit unterschiedlichen Organosilanen immobilisiert wurden (APTMS: 3-Aminopropyltrimethoxysilan, MPTMS: 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan, PTMS: Propyltrimethoxysilan).

Nachdem APTMS als geeigneter Linker gewählt war, wurden die Reaktionsparameter während der Immobilisierung optimiert. Abbildung 5-3 zeigt Extinktionsspektren von Goldnanopartikeln, die mit APTMS unter verschiedenen experimentellen Bedingungen immobilisiert wurden. Dabei wurde sowohl die Zeit für die Silanisierung, als auch die Trocknung nach der Silanisierung variiert. Werden die Substrate nach der Silanisierung nicht getrocknet, so kommt es zu einer Aggregation der Nanopartikel, was an der zu längeren Wellenlängen verschobenen Plasmonenbande erkennbar ist (Abbildung 5-3). Die Aggregation kann zu Inhomogenitäten auf den resultierenden Substraten führen. Die Inkubationszeit im Silan hat keinen Einfluss auf die optischen Eigenschaften der Substrate, wie an den nahezu identischen Extinktionsspektren für Substrate mit Silanisierungszeiten von 30 Minuten und 24 Stunden erkennbar ist (Abbildung 5-3).



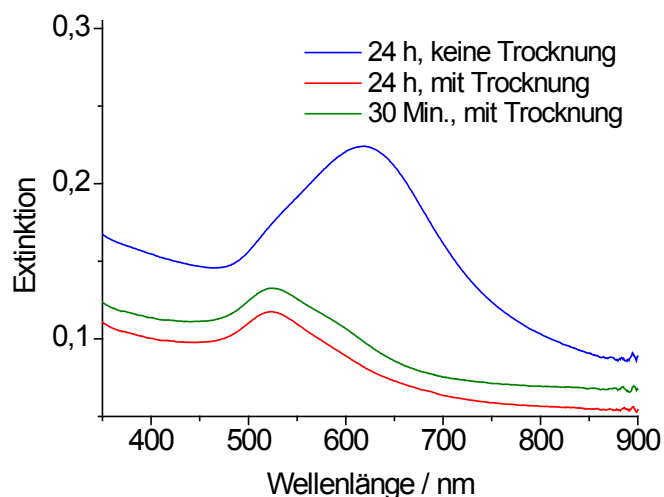


Abbildung 5-3: UV/Vis-Spektren von immobilisierten Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln (Ref.<sup>[114]</sup>, APTMS) bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen während der Immobilisierung (Inkubationszeit im Silan, Trocknung nach Silanisierung).

Um den Einfluss des organischen Rests am Silan und des Lösungsmittels zu untersuchen, wurden die Eigenschaften von Gold- und verschiedenen Silbernanopartikeln verglichen, die mit APTMS ( $X = \text{NH}_2$ ,  $R = \text{CH}_3$  in Abbildung 5-1) und APTES ( $X = \text{NH}_2$ ,  $R = \text{CH}_2\text{-CH}_3$ ) immobilisiert wurden. Im Fall von APTMS wurde Methanol als Lösungsmittel verwendet und im Fall von APTES Wasser. Die Extinktionsspektren der Substrate sind in Abbildung 5-4 dargestellt. Sie weisen die für Gold und Silber typischen Plasmonenbanden auf. Dies zeigt, dass mit beiden Linkermolekülen Nanopartikel immobilisiert werden konnten. Für die meisten Nanopartikel sind keine signifikanten Unterschiede in den Extinktionsspektren in Abhängigkeit des verwendeten Linkermoleküls zu beobachten. Eine Ausnahme bilden die Citrat-reduzierten Silbernanopartikel (Abbildung 5-4, a), bei dem die Extinktion bei Verwendung von APTMS als Linkermolekül, deutlich höher ist, als bei Verwendung von APTES.

Bei identischen Nanopartikeln kann aus der Extinktion die Anzahl an Nanopartikeln auf den Oberflächen abgeschätzt werden. Die deutlich geringere Extinktion der Citrat-stabilisierten Silbernanopartikel, bei Immobilisierung mit APTES im Vergleich zur Immobilisierung mit APTMS (Abbildung 5-4, a), weist darauf hin, dass mit APTES weniger Nanopartikel auf den Oberflächen immobilisiert wurden.

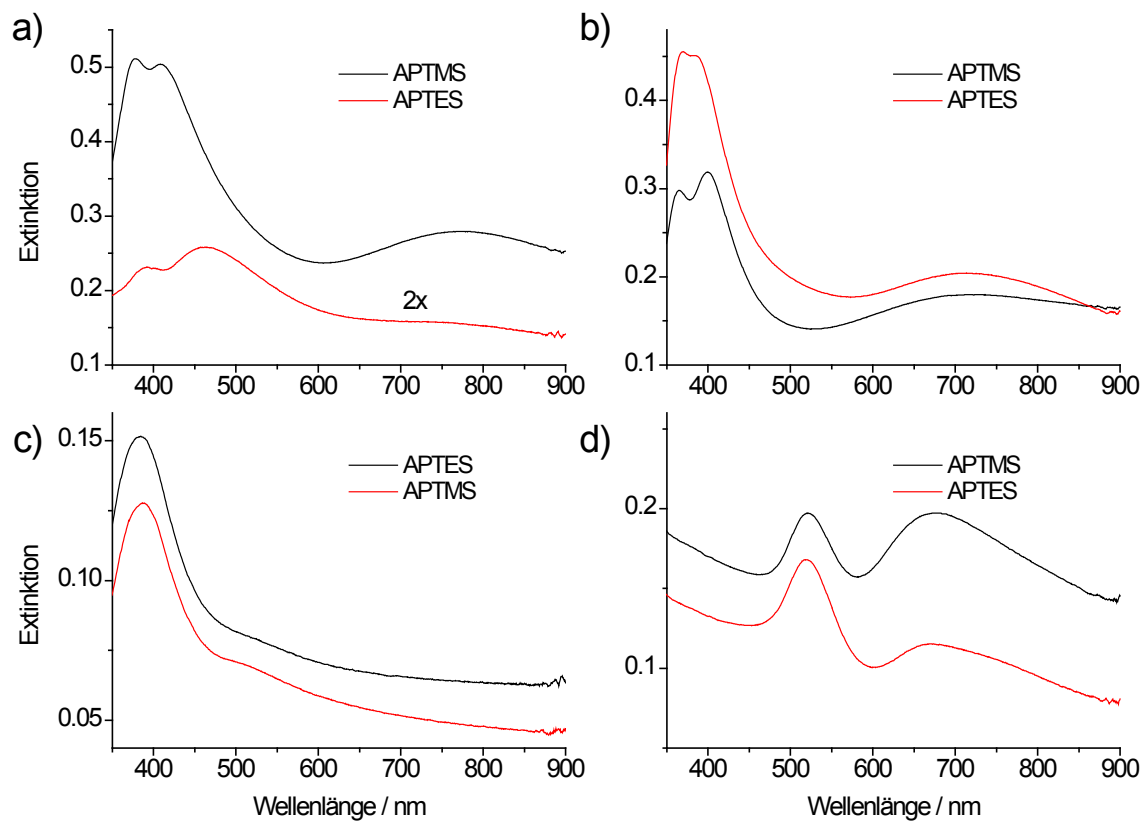


Abbildung 5-4: Extinktionsspektren von a) Citrat-reduzierten Silbernanopartikeln, b) Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln, c) laserablatierten Silbernanopartikeln und d) Citrat-reduzierten Goldnanopartikel immobilisiert mit unterschiedlichen Linkern (APTES: 3-Aminopropyltriethoxysilan, APTMS: 3-Aminopropyltrimethoxysilan).

Zudem ist im Extinktionsspektrum der mit APTMS immobilisierten Citrat-stabilisierten Silbernanopartikel eine erweiterte Plasmonenbande im Wellenlängenbereich zwischen 700 nm und 850 nm erkennbar. Dies deutet auf die Bildung von Aggregaten hin. Im Vergleich zum UV/Vis-Spektrum der Citrat-reduzierten Silbernanopartikel in Lösung, ist die Bande um 400 nm im Extinktionsspektrum der mit APTMS immobilisierten Silbernanopartikel, deutlich schmaler und zu kleineren Wellenlängen verschoben (Vergleich Abbildung 4-1 und Abbildung 5-4, a). Die Bande bei 400 nm entspricht der Bande einzelner Nanopartikel. Die Verschiebung der Plasmonenbande lässt vermuten, dass nicht alle Größen gebunden wurden oder dass die größeren Nanopartikel stärker aggregieren.

Zusätzlich zu den Extinktionsmessungen wurden die mittels APTES immobilisierten Gold- und Silbernanopartikel und die mittels APTMS immobilisierten Citrat-stabilisierten Silbernanopartikel auch mit Rasterkraftmikroskopie (SFM) charakterisiert. Die SFM-Auf-

nahmen und die daraus ermittelten statistischen Daten sind in Abbildung 5-5 und Tabelle 5-1 gezeigt. Für die mit APTES immobilisierten Gold- und Silbernanopartikel weisen die SFM-Aufnahmen homogene Schichten von Nanopartikeln auf (Abbildung 5-5 a und c-e). Die ermittelten Höhen in Tabelle 5-1 stimmen gut mit den aus Transmissionselektronenmikroskopieaufnahmen bestimmten Größen der Nanopartikel (Tabelle 4-1) überein. Aus der Übereinstimmung kann geschlossen werden, dass die Nanopartikel als Monolage auf den Glasoberflächen vorliegen. Wie die erweiterte Plasmonenbande im Extinktionsspektrum bereits vermuten ließ, zeigen die SFM-Aufnahmen der mit APTMS immobilisierten Citrat-stabilisierten Silbernanopartikel große Agglomerate (Abbildung 5-5 b). Die statistische Auswertung der Partikeldichte belegt zudem, dass bei Immobilisierung Citrat-stabilsierter Silbernanopartikel mit APTMS mehr Partikel immobilisiert werden, als bei Immobilisierung mit APTES.

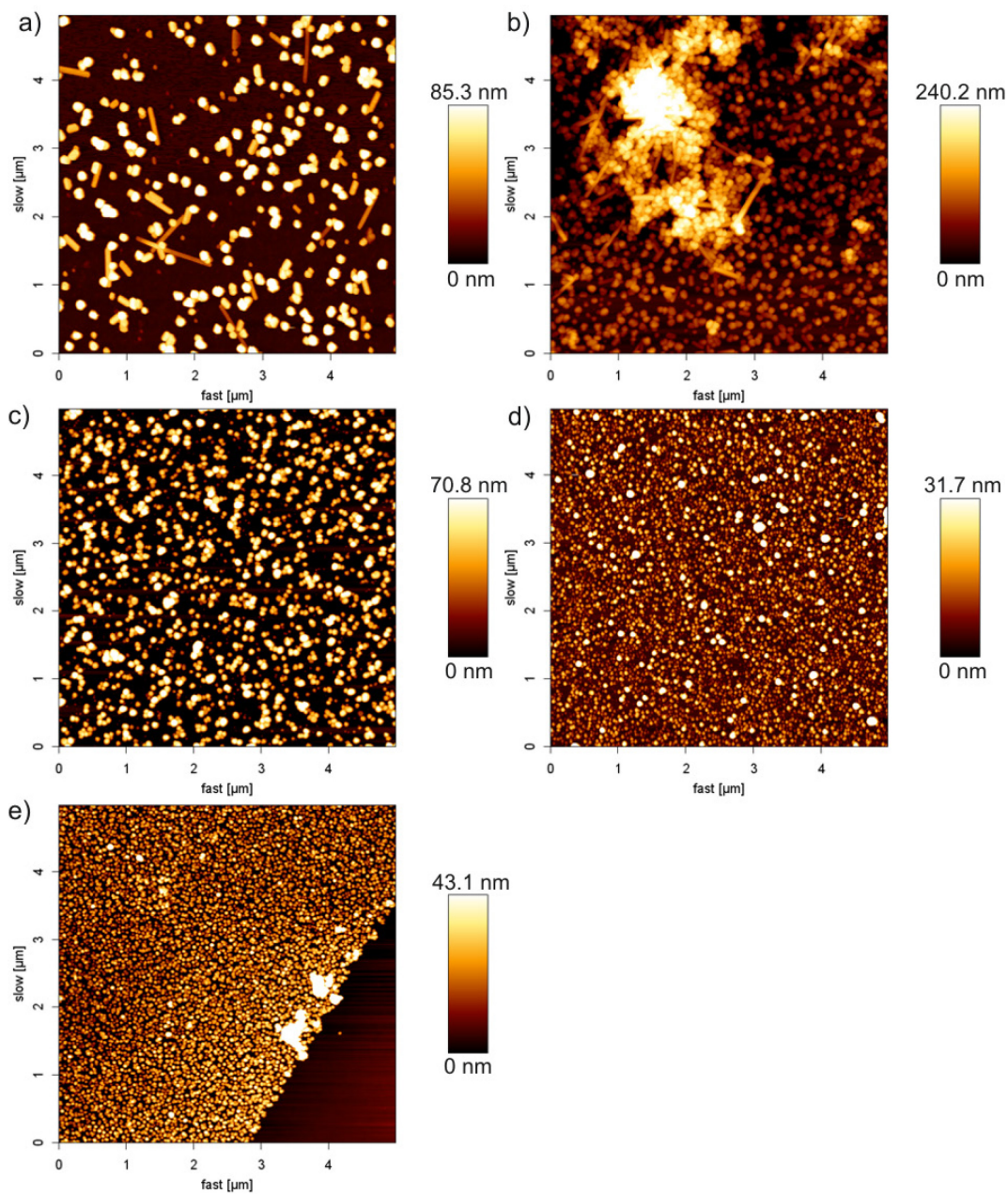


Abbildung 5-5: SFM-Aufnahmen ( $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ) von immobilisierten a, b) Citrat-reduzierten Silbernanopartikeln, c) Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln, d) laserablatierten Silbernanopartikeln und e) Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln. Die Partikel in a und c-e wurden mit APTES immobilisiert und die Partikel in b mit APTES.

Tabelle 5-1: Statistische Daten, die aus den SFM-Bildern in Abbildung 5-5 ermittelt wurden, sowie der durchschnittliche Verstärkungsfaktor der Substrate. Die unterschiedlichen Werte für die Citrat-reduzierten Silbernanopartikel, die mit APTMS immobilisiert wurden, wurden aus zwei Aufnahmen von unterschiedlichen Bereichen auf dem Substrat ermittelt. Für alle anderen Nanopartikel sind die Werte für unterschiedliche Bereiche sehr ähnlich. Ag (C): Citrat-stabilisierte Silbernanopartikel, Ag (H): Hydroxylamin-reduzierte Silbernanopartikel, Ag (LA): laserablatierte Silbernanopartikel, Au (C): Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel, APTMS: 3-Aminopropyltrimethoxysilan, APTES: 3-Aminopropyltriethoxysilan.

Nano-partikel	Linker	Höhe [nm]	Partikel / $\mu\text{m}^2$	Bedeckung der Glasoberfläche mit NP [%]	Oberfläche aller NP / $\mu\text{m}^2$ [ $\text{nm}^2$ ]	durchschn. EF
Ag (C)	APTMS	$48 \pm 12$ , $195 \pm 14$	60 - 100	11-179	$2 \cdot 10^6 - 3 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^5 \pm 8 \cdot 10^4$
Ag, (C)	APTES	$50 \pm 10$	20	4	$6 \cdot 10^5 \pm 6 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^5 \pm 6 \cdot 10^5$
Ag (H)	APTMS					$2 \cdot 10^5 \pm 2 \cdot 10^5$
Ag (H)	APTES	$45 \pm 10$	70	11	$2 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^5$	$7 \cdot 10^5 \pm 4 \cdot 10^5$
Ag (LA)	APTMS					$5 \cdot 10^3 \pm 9 \cdot 10^3$
Ag (LA)	APTES	$20 \pm 3$	230	7	$1 \cdot 10^6 \pm 9 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4 \pm 5 \cdot 10^3$
Au (C)	APTMS					$2 \cdot 10^6 \pm 4 \cdot 10^5$
Au (C)	APTES	$25 \pm 6$	300	15	$2 \cdot 10^6 \pm 3 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^6 \pm 8 \cdot 10^5$

Die Anbindung der Nanopartikel an die Aminosilan-funktionalisierte Glasoberfläche findet über elektrostatische Wechselwirkung der negativ geladenen Nanopartikel mit den positiv geladenen Aminogruppen des Silans statt. Deshalb hängt die Bedeckung der Glasoberfläche mit Nanopartikeln, neben der Größe, vor allem von der Ladung der Nanopartikel und der Ladung der Aminogruppen des Linkermoleküls ab. Ein weiterer Einflussfaktor ist die unterschiedliche Affinität des jeweiligen Metalls zur Aminogruppe. Tabelle 5-1 zeigt die Bedeckung der Glasoberflächen mit Gold- und Silbernanopartikeln. Die höchste Bedeckung wird mit 11-179 % für die Citrat-stabilisierten Silbernanopartikel bei Immobilisierung mit APTMS erreicht. Wie aus den SFM-Aufnahmen ersichtlich, liegen die Partikel auf diesen Substraten jedoch nicht als Monolagen vor, sondern bilden z.T. sehr große Agglomerate (Abbildung 5-5 b). Die Bedeckung der Oberfläche mit den anderen Nanopartikeln liegt zwischen 15 % für die Citrat-stabilisierten Goldnanopartikel und 4 % für die Citrat-stabilisierten Silbernanopartikel, die jeweils mit APTES immobilisiert wurden.

Die Nanopartikellösungen weisen mit  $-32 \pm 1$  mV für die Citrat-stabilisierten Silbernanopartikel,  $-36 \pm 2$  mV für die Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikel,

$-44 \pm 2$  mV für die laserablatierten Silbernanopartikel und  $-27 \pm 3$  mV für die Citrat-stabilisierten Goldnanopartikel, ein ähnlich negatives Zeta-Potenzial auf. Das bedeutet, dass alle Partikel negativ geladen sind und die Anzahl der Ladungen auf der Oberfläche der Nanopartikel sehr ähnlich ist. Die Unterschiede in der Oberflächenbedeckung können also nicht durch eine unterschiedliche Ladung der Nanopartikel erklärt werden. Die Ladung der Aminogruppen der funktionalisierten Glasoberflächen hängt vom Lösungsmittel und vom pH-Wert ab<sup>[105]</sup>. Die pH-Werte der Silbernanopartikellösungen sind mit 6,3 für die laserablatierten Partikel, 6,5 für die Hydroxylamin-reduzierten Partikel und 7,0 für die Citrat-reduzierten Partikel sehr ähnlich. Die Goldnanopartikellösung hingegen weist einen pH-Wert von 4,5 auf, wodurch der Anteil an geladenen Aminogruppen des Silans größer sein sollte, als bei Verwendung von Silbernanopartikellösungen. Aufgrund des größeren Anteils an geladenen Aminogruppen kann eine stärkere elektrostatische Wechselwirkung mit den negativ geladenen Nanopartikeln erwartet werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Gold stabilere Komplexe mit Aminverbindungen bildet als Silber<sup>[178]</sup>. Die Oberflächenbedeckung kann nicht mit einem Parameter allein erklärt werden, sondern ergibt sich aus einem Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Durch die Betrachtung all dieser Faktoren kann die größere Oberflächenbedeckung für die Goldnanopartikel erklärt werden.

Die Oberflächenbedeckung der Substrate mit Silbernanopartikeln korreliert mit der Nanopartikelkonzentration in Lösung (Vergleich Tabelle 5-1 und Tabelle 4-2). Die über statistische Auswertung der Höheninformationen bestimmten Oberflächenbedeckungen sind geringer, als die SFM-Aufnahmen suggerieren. Der Grund ist die in Abschnitt 2.5 erläuterte Spitzenverbreiterung, wodurch die laterale Ausdehnung der Partikel in den Aufnahmen bei Untersuchung mit einer Spitze mit Radius  $r_s$  um den Faktor  $\sqrt{4r_s r_p}$  größer ist, als der tatsächliche Partikelradius  $r_p$ .

Für die Bestimmung der Verstärkung im SERS-Experiment ist neben der Anordnung der Partikel auf den Glasoberflächen auch die Oberfläche aller Nanopartikel im Fokussvolumen wichtig, weil dadurch die Anzahl der am SERS-Prozess teilnehmenden Analytmoleküle  $N_{\text{SERS}}$  bestimmt wird (Vergleich auch Abschnitt 2.4). Die Oberfläche aller Nanopartikel pro Fläche ist für die Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikel, die

laserablatierten Silbernanopartikel und die Citrat-reduzierten Goldnanopartikel ähnlich, während sie bei den Citrat-reduzierten Silbernanopartikeln etwas kleiner ist (Tabelle 5-1).

## **5.2 Verstärkungsfaktoren und mikroskopische Homogenität des Verstärkungsfaktors immobilisierter Nanopartikelsubstrate**

Die SFM-Aufnahmen in Abschnitt 5.1 haben gezeigt, dass die Immobilisierung zu einer homogenen Verteilung der Nanopartikel auf den Glasoberflächen führt. Wie in der Einleitung dieses Kapitels beschrieben, ist die Untersuchung des Verstärkungsfaktors und der mikroskopischen Homogenität der Verstärkung wichtig, wenn die organosilan-immobilisierten Nanopartikeloberflächen als Substrate in mikroskopischen SERS-Experimenten eingesetzt werden sollen. Dazu wurde auf den unterschiedlichen Substraten, jeweils im Abstand von 10  $\mu\text{m}$ , der Verstärkungsfaktor mit Kristallviolett bestimmt, so dass pro Substrat eine Fläche von 100 x 100  $\mu\text{m}^2$  untersucht wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-6 dargestellt.

Alle Substrate zeigten eine Verstärkung der Raman-Signale von CV auf der gesamten untersuchten Fläche. Die Verstärkungsfaktoren reichen dabei von ca.  $10^4$  für die laserablatierten Silbernanopartikel bis ca.  $10^6$  für die Gold- und die Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikel (Abbildung 5-6 und Tabelle 5-1). Die Verstärkungsfaktoren, der mit APTES immobilisierten Nanopartikel, sind für alle Nanopartikelarten höher, als die der APTMS immobilisierten Nanopartikel. Das Linkermolekül muss also einen Einfluss auf die nanoskopische Struktur der Substrate haben. Die Unterschiede in den Verstärkungsfaktoren lassen sich durch die unterschiedliche Anordnung der Nanopartikel auf den Oberflächen erklären.

Abbildung 5-7 zeigt SFM-Aufnahmen, die auf einer Fläche von 1 x 1  $\mu\text{m}^2$  aufgenommen wurden. Die Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikel (Abbildung 5-7 a) und die Citrat-reduzierten Goldnanopartikel (Abbildung 5-7 c) bilden auf der Oberfläche kleine, stabile Aggregate aus, während die laserablatierten Silbernanopartikel vorwiegend einzeln vorliegen (Abbildung 5-7 b). Wie bereits in Kapitel 4.3 diskutiert, treten zwischen den Partikeln solcher Aggregate besonders hohe Feldverstärkungen auf.

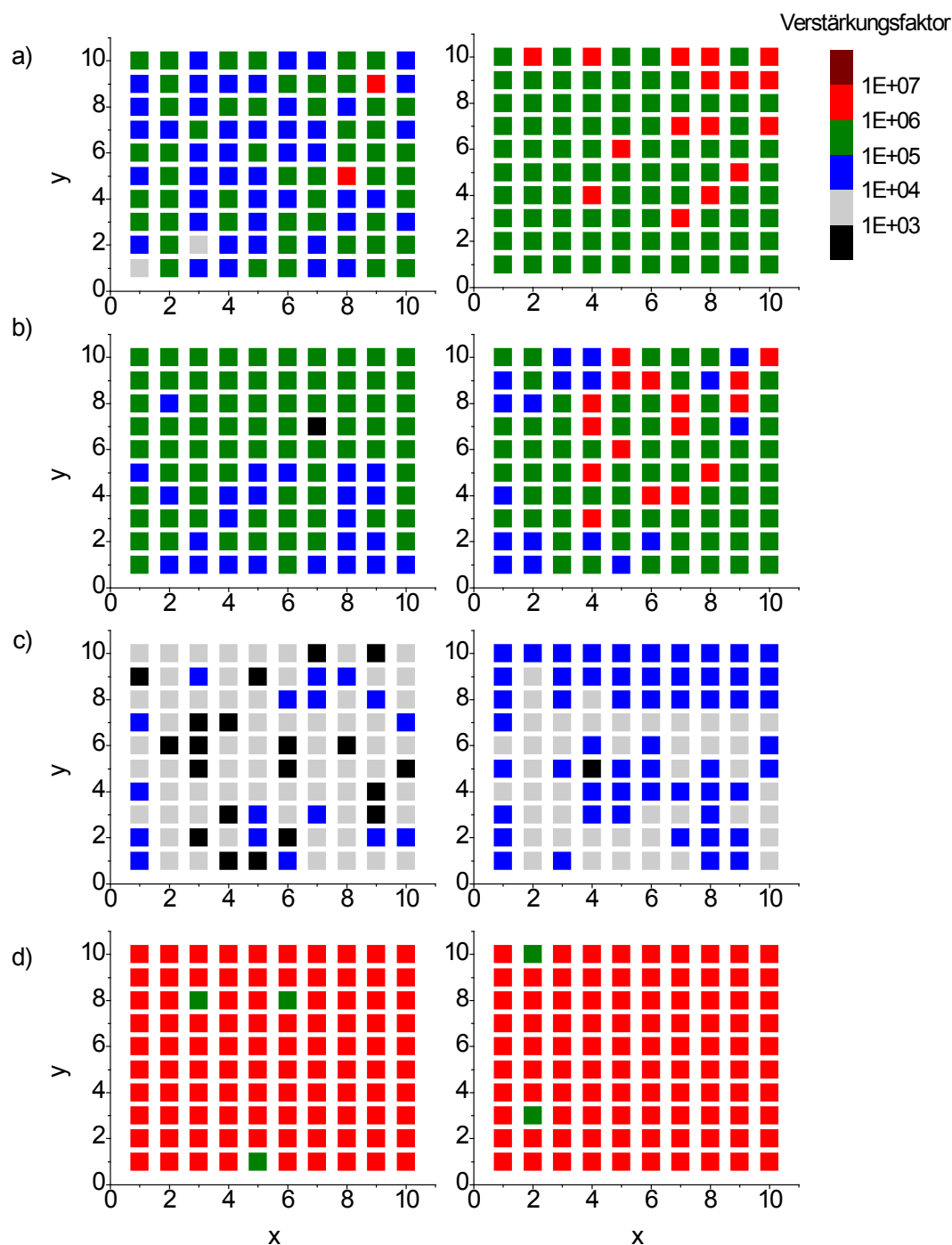


Abbildung 5-6: Schematische Verteilung des Verstärkungsfaktors in Abhängigkeit von der Position (x, y) auf Oberflächen mit a) Citrat-reduzierten Silbernanopartikeln, b) Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln, c) laserablatierten Silbernanopartikeln und d) Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln, die mit APTMS (linke Spalte) bzw. APTES (rechte Spalte) immobilisiert wurden. Die Verstärkungsfaktoren wurden mit  $5 \cdot 10^{-6}$  M CV als Analyt bestimmt. Die SERS-Spektren wurden in einem Abstand von  $10 \mu\text{m}$  aufgenommen ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ , Intensität:  $2,7 \cdot 10^3 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $1 \text{ s}$ ) und der Durchmesser der Messpunkte betrug  $1,5 \mu\text{m}$  (nicht skaliert in der Darstellung).



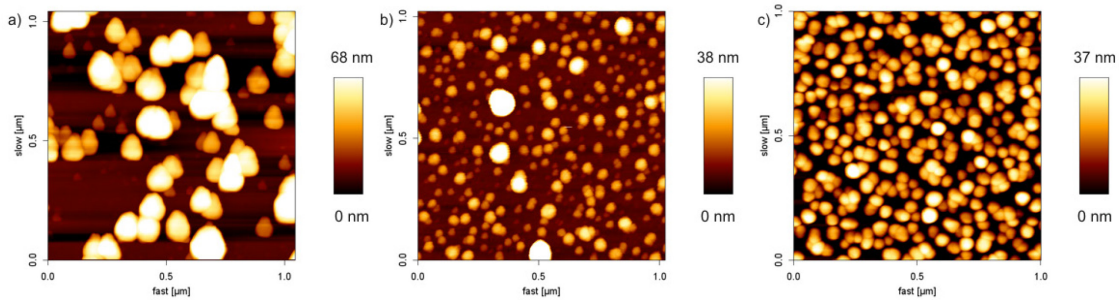


Abbildung 5-7: SFM-Aufnahmen ( $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ ) von a) Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln, b) laserablatierten Silbernanopartikeln und c) Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln, die mit APTES immobilisiert wurden.

Eine besonders hohe Homogenität in der Verteilung der Verstärkung wird mit den Goldnanopartikeln erreicht (Abbildung 5-6 b), was auf die geringe Polydispersität der Partikel und die gleichmäßige Anordnung auf den Oberflächen zurückgeführt werden kann (Abbildung 5-5 e). Auch die anderen Substrate weisen eine homogene Verteilung auf, wobei die Homogenität bei Verwendung von APTES etwas besser ist, als bei Verwendung von APTMS (Abbildung 5-6 a-c). Die Verteilung des Verstärkungsfaktors auf den Substraten mit Citrat-reduzierten Silbernanopartikeln ist, mit wenigen Stellen hoher Verstärkung, am inhomogensten (Abbildung 5-6 a). Dies ist auf die inhomogene Verteilung der Nanopartikel und die Ausbildung großer Agglomerate (Vergleich Abbildung 5-5) zurückzuführen.

Die Verstärkungsfaktoren, die für die immobilisierten Gold- und Silbernanopartikelsubstrate bestimmt wurden, sind gut mit denen bisher hergestellter flächiger SERS-Substrate, wie Inselfilme<sup>[179]</sup>, mittels *elektro-deposition* und Elektronenstrahlolithographie hergestellte Goldnanopartikelanordnungen<sup>[180,181,182]</sup> und immobilisierten Nanopartikeln auf Silberstäbchen<sup>[183]</sup>, wo Verstärkungsfaktoren zwischen  $10^4$  und  $10^8$  erhalten wurden, vergleichbar. Neben diesen Substraten gibt es auch kommerziell erhältliche SERS-Substrate. Häufig sind bei diesen Substraten die Herstellungsweise und die Oberfläche, auf der sich die Nanopartikel befinden, nicht genauer definiert. Der Hersteller Nanova Inc. vertreibt ein Substrat Q-SERS GP1, welches aus Goldnanopartikeln auf einer Oberfläche besteht.

Die Untersuchung der Verteilung des Verstärkungsfaktors mit CV auf Q-SERS GP1 (Nanovia Inc.) ergab eine deutlich geringere Verstärkung ( $1 \cdot 10^4$ , Abbildung 5-8), als mit den organosilan-immobilisierten Goldnanopartikeln ( $2 \cdot 10^6$ , Abbildung 5-6).

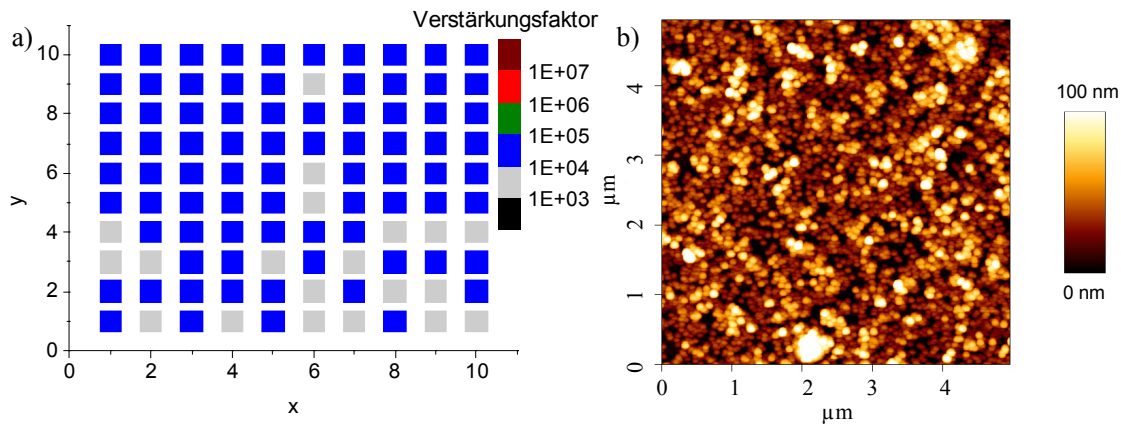


Abbildung 5-8: a) Schematische Verteilung des Verstärkungsfaktors in Abhängigkeit der Position (x,y) auf Q-SERS GP1 (Nanovia Inc.) und b) SFM-Aufnahme eines Ausschnitts der Oberfläche von Q-SERS GP1(Nanovia Inc.). Die Verstärkungsfaktoren wurden mit  $5 \cdot 10^{-6}$  M CV als Analyt bestimmt. Die SERS-Spektren wurden in einem Abstand von  $10 \mu\text{m}$  aufgenommen ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ , Intensität:  $6,7 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 1 s) und der Durchmesser der Messpunkte betrug  $1,5 \mu\text{m}$  (nicht skaliert in der Darstellung).

Auch die Homogenität der Verstärkung ist auf dem kommerziell erhältlichen Substrat geringer. Die SFM-Aufnahmen in Abbildung 5-8 zeigen, dass die Nanopartikel z.T. sehr große Aggregate bilden und die Größenverteilung deutlich inhomogener ist, als bei den in dieser Arbeit hergestellten Oberflächen mit Goldnanopartikeln (Vergleich mit Abbildung 5-5).

Die in diesem Abschnitt diskutierten Ergebnisse zeigen, dass durch die Immobilisierung von Gold und Silbernanopartikeln mit Aminosilanen stabile, nanostrukturierte Oberflächen mit hoher nanoskopischer Homogenität hergestellt werden können. Die Charakterisierung der Oberflächen mit UV/Vis-Spektroskopie und SFM deuten darauf hin, dass die Nanopartikel Monolagen bilden und Verstärkungsfaktoren größer als  $10^4$  in Zusammenhang mit der Bildung von Nanoaggregaten auf den Oberflächen stehen. Die hohe Homogenität der Verstärkung auf mikroskopischer Ebene macht die auf den Oberflächen immobilisierten Nanopartikel zu idealen Substraten für den Einsatz als mikroskopische SERS-Sensoren.

### 5.3 Untersuchung der Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Analytkonzentration für immobilisierte, monodisperse Goldnanopartikel

Im Abschnitt 4.3 wurde gezeigt, dass der Verstärkungsfaktor bei Verwendung von Nanopartikeln in Lösung stark von der Analytkonzentration abhängt. Um eine Unabhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Analytkonzentration durch Vermeidung analyt-induzierter Aggregation zu erreichen, wurden Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel mit einem Radius von 7 nm und 15 nm, die auch für die Experimente in Abschnitt 4.3 verwendet wurden, mittels APTES auf Glasoberflächen immobilisiert.

Abbildung 5-9 zeigt die Extinktionsspektren der Oberflächen. Die Nanopartikeloberflächen weisen für Goldnanopartikel typische Plasmonenbanden mit einem Maximum bei 529 nm für die Partikel mit 7 nm Radius und bei 521 nm für die Partikel mit 15 nm Radius auf. Im Vergleich zu den Nanopartikeln in Lösung ist das Maximum der Partikel mit 7 nm Radius zu größeren Wellenlängen verschoben ( $\lambda_{\text{max,Lösung}}$ : 520 nm, Tabelle 4-2) und die Plasmonenbande ist deutlich verbreitert (Vergleich Abbildung 5-9 und Abbildung 4-5). Dies weist darauf hin, dass der Abstand zwischen den Partikeln sehr klein ist<sup>[36]</sup>. Das Maximum der Plasmonenbande der Partikel mit 15 nm ist zu kleineren Wellenlängen verschoben ( $\lambda_{\text{max,Lösung}}$ : 526 nm, Tabelle 4-2) und es tritt eine erweiterte Plasmonenbande auf. Die erweiterte Plasmonenbande lässt eine Aggregatbildung auf den Oberflächen vermuten.

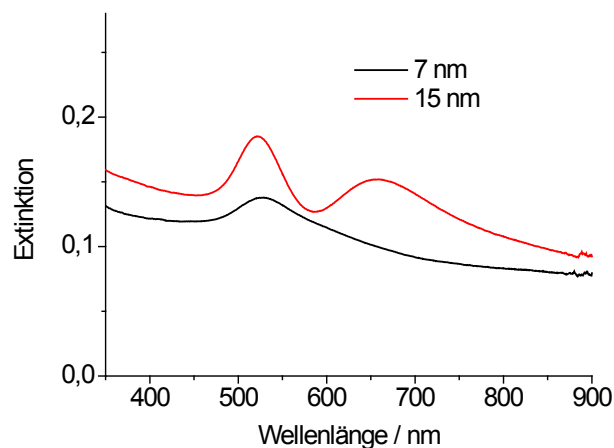


Abbildung 5-9: Extinktionsspektren von Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln mit einem Radius von 7 nm und 15 nm, die mit APTES auf Glasoberflächen immobilisiert wurden.

In Abbildung 5-10 sind die SFM-Aufnahmen der Oberflächen dargestellt. Wie die SFM-Aufnahme (Abbildung 5-10 a) und die aus den SFM-Experimenten ermittelten statis-

tischen Daten in Tabelle 5-2 zeigen, bilden die Partikel mit 7 nm Radius eine dichte Monolage mit geringem Abstand zwischen den Nanopartikeln. Die Goldnanopartikel mit 15 nm Radius bilden auf den Oberflächen ebenfalls eine Monolage (Tabelle 5-2) und liegen überwiegend als Aggregate von wenigen Partikeln vor (Abbildung 5-10 b).

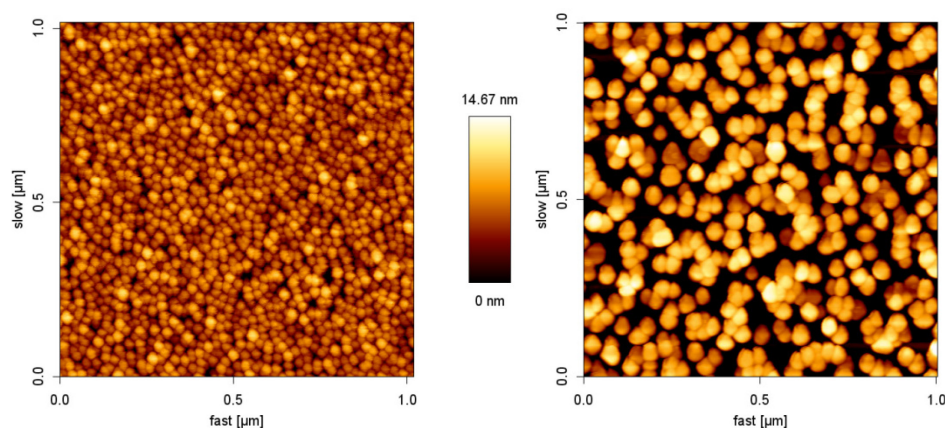


Abbildung 5-10: SFM-Aufnahmen von immobilisierten, monodispersen, Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln mit einem Radius von a) 7 nm und b) 15 nm (Linker: APTES).

Tabelle 5-2: Statistische Daten ermittelt aus den SFM-Aufnahmen in Abbildung 5-10.

Nanopartikel	Höhe [nm]	Partikel / $\mu\text{m}^2$	Gesamtoberfläche aller NP [nm $^2$ ]	Oberflächenbedeckung [%]
Gold (Citrat), r = 7 nm	$12 \pm 1$	1100	$2 \cdot 10^6 \pm 8 \cdot 10^4$	12
Gold (Citrat), r = 15 nm	$25 \pm 4$	350	$3 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^5$	17

Der Verstärkungsfaktor auf den Oberflächen wurde mit Kristallviolett (CV) in einem Konzentrationsbereich von  $1 \cdot 10^{-6}$  bis  $1 \cdot 10^{-5}$  bestimmt (Abbildung 5-11). Dabei wurden Verstärkungsfaktoren von  $\sim 1 \cdot 10^5$  für die Goldnanopartikel mit 7 nm Radius und  $\sim 1 \cdot 10^7$  für die Goldnanopartikeln mit einem Radius von 15 nm erhalten. Im Vergleich zu denselben Nanopartikeln in Lösung ist die Verstärkung auf den Oberflächen um den Faktor  $10^4$  höher. Die Erhöhung des Verstärkungsfaktors kann durch die größere Nähe der Nanopartikel auf den Oberflächen erklärt werden, die die Ausbildung sehr hoher lokaler Felder hervorruft<sup>[10,34,71]</sup>.

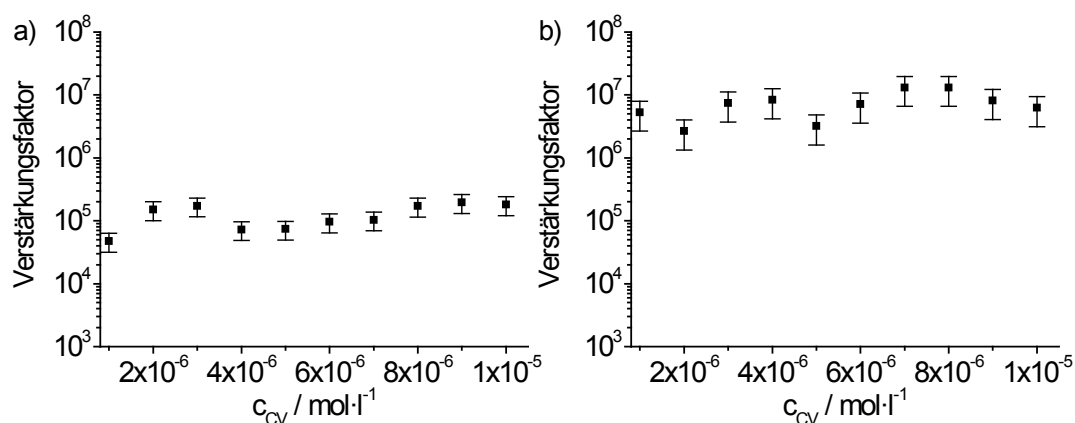


Abbildung 5-11: Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Kristallviolett-Konzentration auf immobilisierten monodispersen, Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln mit einem Radius von a) 7 nm und b) 15 nm.

Die Verstärkungsfaktoren, die für unterschiedliche CV-Konzentrationen bestimmt wurden sind sehr ähnlich (Abbildung 5-11). Dies zeigt, dass die Immobilisierung mit Organosilanen zu einer Stabilisierung im Vergleich zu identischen Nanopartikeln in Lösung führt, wo eine Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Analytkonzentration beobachtet wurde (Abschnitt 4.3). Der konstante Verstärkungsfaktor über einen großen Analytkonzentrationsbereich, aufgrund der erhöhten Stabilität, ermöglicht quantitative SERS-Messungen ohne internen Standard bei der Verwendung organosilan-immobilisierter Nanopartikel.

#### 5.4 Herstellung und Charakterisierung von Misch-Substraten mit unterschiedlichen Gold- und Silbernanopartikeln

Prinzipiell sollte die Immobilisierung von Nanopartikeln mit Organosilanen die einfache Herstellung von Oberflächen mit unterschiedlichen Nanopartikeln ermöglichen. In diesem Kapitel sollen die Eigenschaften solcher gemischten Oberflächen aus Gold- und Silbernanopartikeln diskutiert werden.

Durch die Kombination unterschiedlicher Metalle können die plasmonischen und funktionellen Eigenschaften von Nanostrukturen bzw. nanostrukturierten Oberflächen verändert und so für die jeweilige Anwendung optimiert werden<sup>[184], [185]</sup>. In Gold-Silber-Mischsubstraten wird beispielsweise das Extinktionsmaximum durch das Mischungsverhältnis von Gold und Silber bestimmt und kann so der Anregungswellenlänge angepasst werden, um eine hohe SERS-Verstärkung zu erreichen. Manche Analytmoleküle

weisen zudem unterschiedliche Adsorptionseigenschaften auf Gold- und Silberoberflächen<sup>[186]</sup>. Dies könnte bei der Erzeugung neuartiger Oberflächenfunktionalitäten, welche sich beispielsweise zur Anreicherung oder Separation von Analytmolekülen verwenden lassen, Einsatz finden.

Bisher wurden in der Regel Kern-Schale-Nanopartikel eingesetzt<sup>[185,187,188,189]</sup>. Die optischen Eigenschaften der resultierenden Nanopartikel hängen von der Schichtdicke der Schale ab und davon ob Gold- oder Silber als Kern gewählt wird<sup>[187,188,189]</sup>. Für die Herstellung der gemischten Gold-Silber-Substrate in dieser Arbeit wurden Citrat-reduzierte Goldnanopartikel und Citrat-reduzierte (Ag(c)), sowie Hydroxylamin-reduzierte Silbernanopartikel (Ag(h)) verwendet. Zur Untersuchung der plasmonischen Eigenschaften der Mischsubstrate in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis der Gold- und Silbernanopartikel, wurde dieses variiert. Die Extinktionsspektren der unterschiedlichen Substrate sind in Abbildung 5-12 gezeigt. Alle Spektren weisen die für Gold- und Silbernanopartikel typischen Plasmonenbanden bei  $\sim 400$  nm und  $\sim 520$  nm auf, die, je nach Mischungsverhältnis, in ihrer Intensität variieren (Abbildung 5-12 b).

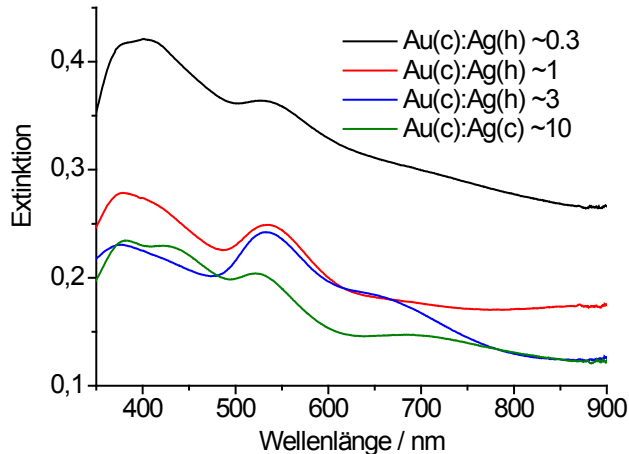


Abbildung 5-12: Extinktionsspektren von gemischten Gold-Silber-Substraten, die mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Gold- und Silbernanopartikeln in der Nanopartikellösung hergestellt wurden. (Au (c): Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel, Ag (c): Citrat-stabilisierte Silbernanopartikel, Ag (h): Hydroxylamin-reduzierte Silbernanopartikel, Linker: APTES).

REM-Aufnahmen und EDX-Spektren der Substrate, die in Abbildung 5-13 gezeigt sind, bestätigen, dass sowohl Gold- als auch Silbernanopartikel immobilisiert wurden und auf der gesamten Fläche homogen verteilt sind. Die Menge und Anordnung der Partikel auf den Oberflächen, sowie das Verhältnis von Gold- zu Silbernanopartikeln hängt neben der



Herstellungsart der Nanopartikel auch vom Gold-Silber-Partikelverhältnis in der jeweiligen Mischung ab. Die höchste Dichte an Nanopartikeln wird bei Verwendung von Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln und Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln im Verhältnis 3:1 in der Inkubationslösung erreicht, während die Substrate mit einer Mischung von Citrat-reduzierten Gold- und Silbernanopartikeln im Verhältnis 10:1 in der Inkubationslösung die geringste Dichte aufweisen (Vergleich Abbildung 5-13 a und c).

Das Verhältnis von Gold- zu Silbernanopartikeln auf den Oberflächen entspricht nicht dem Verhältnis der Partikel in Lösung. Bei den Mischungen von Gold- und Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln (Abbildung 5-13 a und b) ist das Partikelverhältnis von Gold zu Silber mit 14:1 und 4:1 auf den Oberflächen für Partikelverhältnisse von 3:1 und 0,3:1 in Lösung auf den Substraten größer als in Lösung. Bei den Citrat-reduzierten Silbernanopartikeln (Abbildung 5-13 c) ist dagegen ein Anteil an Goldnanopartikeln von 12:1 zu beobachten. Dort entspricht das Verhältnis von Gold zu Silber ungefähr dem Partikelverhältnis in Lösung (10:1).

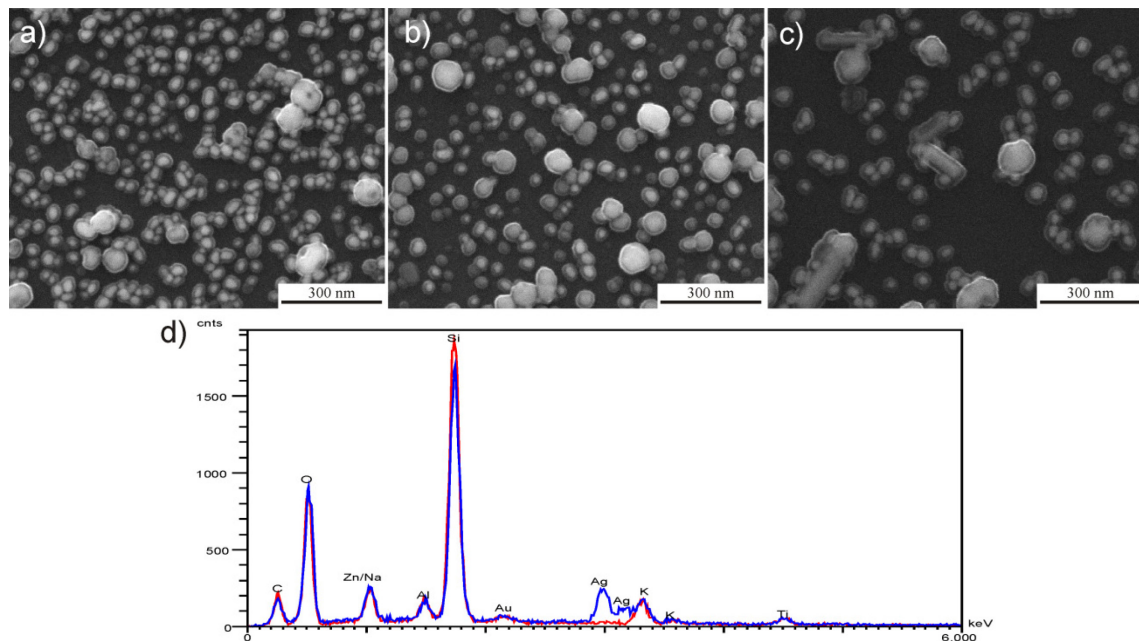


Abbildung 5-13: REM-Aufnahmen gemischter Gold-Silber-Substrate: a) Au(c):Ag(h)  $\sim$  3, b) Au(c):Ag(h)  $\sim$  0,3, c) Au(c):Ag(c)  $\sim$  10 (Verhältnis von Gold zu Silbernanopartikeln in den Nanopartikellösungen). (Au (c): Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel, Ag (c): Citrat-stabilisierte Silbernanopartikel, Ag (h): Hydroxylamin-reduzierte Silbernanopartikel, Linker: APTES). Zur Verbesserung der Leitfähigkeit der Proben wurden diese mit Kohlenstoff bedampft. d) EDX-Spektren von Punktanalysen zweier verschiedener Partikel auf einem gemischten Gold-Silber-Substrat.

Die Goldnanopartikel bilden, wie auch bei Verwendung reiner Goldnanopartikellösungen, kleine Aggregate und lagern sich zum Teil um die Silbernanopartikel an, sodass Mischaggregate gebildet werden (Abbildung 5-13). Dies tritt bevorzugt bei der Verwendung von Citrat-reduzierten Silbernanopartikeln auf, wo neben sphärischen auch stäbchenförmige Silbernanopartikel vorhanden sind (Abbildung 5-13 c). Die Größe und Anzahl der Goldnanopartikelaggregate auf den Substraten mit Gold- und Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln hängt vom Anteil an Goldnanopartikeln in der Lösung ab. Je größer der Anteil der Goldnanopartikel ist, desto mehr Aggregate sind vorhanden, und desto größer sind diese (Vergleich Abbildung 5-13 a und b).

Die Beobachtungen bestätigen die Vermutung aus Abschnitt 5.1, dass die Wechselwirkung von Gold- und Silbernanopartikeln mit dem Linker unterschiedlich ist. Aufgrund der unterschiedlichen Dichten und Gold-Silber-Verhältnisse in Abhängigkeit von der Herstellungsart, muss neben der Art des Metalls auch die chemische Beschaffenheit der Oberflächen (Art der Ionen an der Oberfläche der Nanopartikel) einen Einfluss auf die Wechselwirkung haben. Die Nanostruktur der Oberflächen wird wesentlich von der Zusammensetzung der Mischung in der Inkubationslösung beeinflusst.

Der Verstärkungsfaktor auf den gemischten Gold-Silber-Substraten wurde unter Verwendung von Kristallviolett untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-14 dargestellt. Sie zeigen eine sehr homogene Verteilung des Verstärkungsfaktors. Die Verstärkungsfaktoren der Substrate mit einem hohen Goldanteil ( $\text{Au(c):Ag(h)} \sim 3$  und  $\text{Au(c):Ag(h)} \sim 1$ ) sind denen der reinen Goldsubstrate sehr ähnlich (Vergleich Abbildung 5-14 a und b mit Abbildung 5-6 d), während die mit einem hohen Silberanteil ( $\text{Au(c):Ag(h)} \sim 0,3$ ) etwas niedriger sind und denen der reinen Silbersubstrate entsprechen (Vergleich Abbildung 5-14 c mit Abbildung 5-6 b). Die Homogenität der Verstärkung auf den Substraten mit einem hohen Silberanteil ( $\text{Au(c):Ag(h)} \sim 0,3$ ) ist höher als bei den Substraten, auf denen ausschließlich Silbernanopartikel immobilisiert wurden (Vergleich Abbildung 5-14 c mit Abbildung 5-6 b). Durch die simultane Immobilisierung kleiner Mengen Goldnanopartikel kann die mikroskopische Homogenität des Verstärkungsfaktors von Oberflächen mit einem hohen Anteil an Silbernanopartikeln erhöht werden.



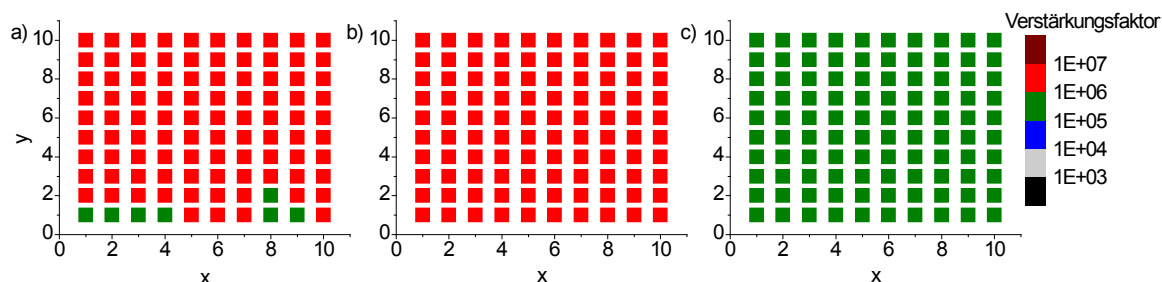


Abbildung 5-14: Schematische Verteilung des Verstärkungsfaktors in Abhängigkeit der Position (x,y) auf gemischten Gold-Silbersubstraten bestehend aus Citrat-reduzierten Gold- und Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln mit einem Mischungsverhältnis von a) Au:Ag  $\sim 3$ , b) Au:Ag  $\sim 1$ , Au:Ag  $\sim 0.3$  in der Inkubationslösung. Die Verstärkungsfaktoren wurden mit  $5 \cdot 10^{-6}$  M Kristallviolett als Analyt bestimmt. Die SERS-Spektren wurden in einem Abstand von  $10 \mu\text{m}$  aufgenommen ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ , Intensität:  $2,7 \cdot 10^3 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 1 s) und der Durchmesser der Messpunkte betrug  $1,5 \mu\text{m}$  (nicht skaliert in der Darstellung).

Die Ergebnisse zeigen, dass Gold- und Silbernanopartikel simultan unter Verwendung desselben Aminosilanlinkers immobilisiert werden können. Aufgrund der unterschiedlichen Wechselwirkung von Analytmolekülen mit Gold- und Silbernanopartikeln<sup>[175]</sup>, können sich aus der Mischung dieser Nanopartikel neue Funktionalitäten der Oberflächen ergeben. Da die Verstärkung der gemischten Oberflächen, der Verstärkung der reinen Gold- und Silbernanopartikel in Abhängigkeit des Mischungsverhältnisses entspricht, ermöglichen solche gemischten Oberflächen Untersuchungen zur Wechselwirkung von Analytmolekülen mit den Nanopartikeloberflächen und Messungen mit verbesserter Separation von Analytmolekülen.

Eine weitere Möglichkeit, Gold- und Silbernanopartikel auf Substraten zu mischen, ist die Immobilisierung von Gold- bzw. Silbernanopartikeln mit APTES und anschließende Funktionalisierung der Nanopartikel mit einem Molekül mit zwei funktionellen Gruppen (z.B. *p*-Aminothiophenol, PATP)<sup>[190]</sup>. Bei Inkubation der funktionalisierten Substrate in einer Lösung mit Nanopartikeln des entsprechend anderen Metalls, werden diese Nanopartikel durch das PATP gebunden (Schema in Abbildung 5-15).

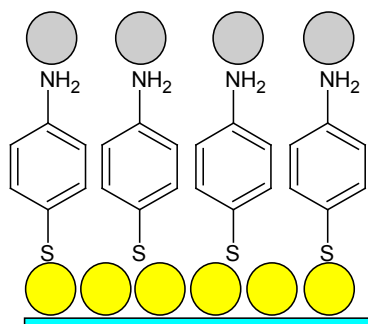


Abbildung 5-15: Vereinfachte Schematische Darstellung der Struktur gemischter Gold-Silber-Nanopartikeloberflächen hergestellt mit PATP.

Extinktionsspektren von Oberflächen, bei denen zunächst Citrat-stabilisierte Gold- und anschließend Hydroxylamin-reduzierte Silbernanopartikel unter Verwendung unterschiedlicher PATP-Konzentrationen immobilisiert wurden, sind in Abbildung 5-16 gezeigt. Die Spektren weisen Plasmonenbanden mit einem Maximum bei  $\sim 400$  nm und  $\sim 520$  nm, sowie eine erweiterte Plasmonenbande im Bereich zwischen 600 nm und 700 nm auf. Die Plasmonenbanden können Gold- bzw. Silbernanopartikeln zugeordnet werden. Das weist darauf hin, dass mit beiden PATP-Konzentrationen Silbernanopartikel auf den Goldnanopartikeloberflächen gebunden wurden.

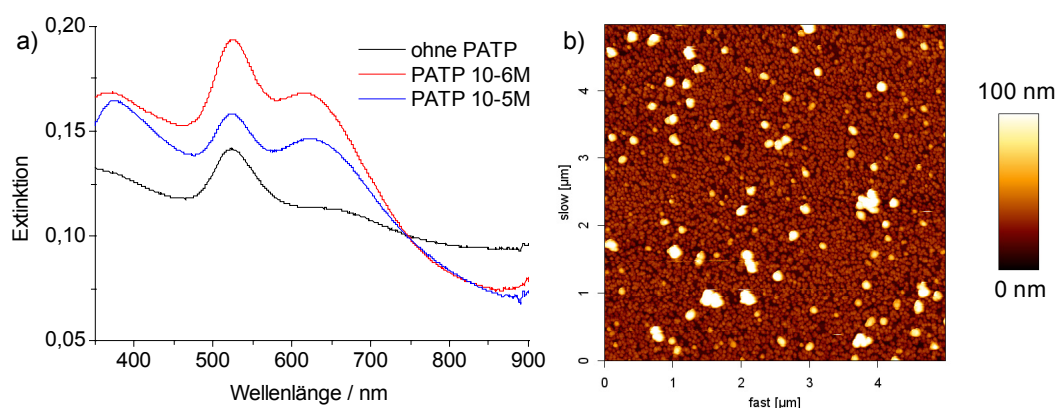


Abbildung 5-16: a) Extinktionsspektren von Goldnanopartikelsubstraten, die mit PATP funktionalisiert und anschließend in einer Lösung mit Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. b) SFM-Aufnahme eines Ausschnitts ( $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ) des Substrats aus a) mit  $10^{-5}$  M PATP (blaues Spektrum).

Um zu überprüfen, ob die Anbindung der Silbernanopartikel tatsächlich über das PATP stattfindet und nicht über freie Anbindungsstellen des Aminosilanlinkers, wurden immobilisierte Goldnanopartikel ohne Funktionalisierung mit PATP zu einer Silbernanopartikellösung gegeben. In diesem Fall tritt keine Plasmonenbande bei 400 nm auf

(schwarzes Spektrum in Abbildung 5-16). Es kann also davon ausgegangen werden, dass keine Bindung von Silbernanopartikeln stattgefunden hat und die Anbindung der Silbernanopartikel auf einer Wechselwirkung mit dem PATP beruht. Je nach Konzentration von PATP während der Funktionalisierung, ist die zusätzliche Plasmonenbande von Silber bei ~400 nm unterschiedlich stark ausgeprägt (Vergleich blaues und rotes Spektrum in Abbildung 5-16). Das deutet darauf hin, dass in Abhängigkeit der PATP-Konzentration unterschiedliche Mengen an Silbernanopartikeln auf den Goldnanopartikelsubstraten immobilisiert wurden. Unter der Annahme, dass ein PATP-Molekül eine Fläche von  $0,19 \text{ nm}^2$  besetzt<sup>[122]</sup>, kann für beide verwendeten Konzentrationen ( $10^{-5} \text{ M}$  und  $10^{-6} \text{ M}$ ) eine vollständige Bedeckung der Nanopartikeloberflächen mit PATP angenommen werden, sodass keine Unterschiede in der Menge der gebundenen Silbernanopartikel zu erwarten wären. Die unterschiedlichen Mengen an gebundenen Silbernanopartikeln lassen vermuten, dass die Konzentration in der Funktionalisierungslösung nicht der Konzentration auf den Nanopartikeloberflächen entspricht.

Die Rasterkraftmikroskopieaufnahme in Abbildung 5-16 b zeigt, dass Goldnanopartikel eine gleichmäßige Schicht bilden, auf der die Silbernanopartikel zum Teil einzeln und zum Teil als kleine Aggregaten vorliegen. SERS-Messungen von PATP auf reinen Goldnanopartikeloberflächen und den gemischten Gold-Silbernanopartikeloberflächen haben eine Signalsteigerung von PATP um den Faktor 10 ergeben (Daten nicht gezeigt). Die Signalsteigerung lässt sich auf die höhere Anzahl an Nanopartikeln auf den gemischten Gold-Silberoberflächen zurückführen. Diese Herstellung der Substrate belegt, dass Silbernanopartikel auf Goldnanopartikeln gebunden werden können und so die plasmonischen Eigenschaften beeinflussbar sind. Für eine Detektion von Analytmolekülen über SERS eignen sie sich aufgrund des intensiven Signals von PATP jedoch nicht.

## **6. Elektronenstrahlolithographisch hergestellte Goldnanopartikeloberflächen als SERS-Substrate und Vergleich mit immobilisierten Nanopartikeln**

Nanolithographische Verfahren haben in jüngster Zeit zunehmend an Bedeutung für die Herstellung von SERS-Substraten gewonnen, da sie sehr reproduzierbar durchgeführt werden können. Bei einer lithographischen Herstellung können Größe, Form und Abstand zwischen den Partikeln genau eingestellt werden<sup>[43,44]</sup>. Dadurch können mit nanolithographisch hergestellten Substraten Untersuchungen zum Einfluss des Abstandes zwischen den Nanostrukturen, sowie von ihrer Form und Größe auf die Eigenschaften im SERS-Experiment, durchgeführt werden. Durch Vergleich mit theoretischen Vorhersagen aus elektrodynamischen Simulationen zur Feldverstärkung, können so SERS-Substrate mit immobilisierten Partikeln gezielt für den Einsatz in spezifischen analytischen Anwendungen optimiert werden. Nachteilig sind allerdings der sehr hohe technische Aufwand und die hohen Kosten der Herstellung.

Aufgrund der Möglichkeit mittels Elektronenstrahlolithographie definierte plasmonische Oberflächen herzustellen, wurden die in dieser Arbeit durch Immobilisierung generierten Nanopartikeloberflächen mit lithographisch hergestellten Substraten verglichen. Insbesondere lassen sich damit die folgenden Erkenntnisse gewinnen:

- 1) Der Einfluss von Größe und Abstand der Nanopartikel auf die SERS-Verstärkung
- 2) Mögliche Effekte des Organosilanlinkers im Fall der immobilisierten Nanopartikel auf die SERS-Verstärkung, da in der Nanolithographie kein Linker eingesetzt wird.

Für die Experimente wurden mit Elektronenstrahlolithographie flächige Substrate hergestellt, deren nanoskopische Eigenschaften, denen der immobilisierten Partikel ähnlich sind. Die Oberflächen bestehen aus periodisch angeordneten Goldzylindern mit einer Höhe von 40 nm auf einem Siliziumwafer (Abbildung 6-1 a). Die Höhe und der Durchmesser der Zylinder entsprechen ungefähr dem Durchmesser der immobilisierten Goldnanopartikel (siehe Kapitel 5.1).

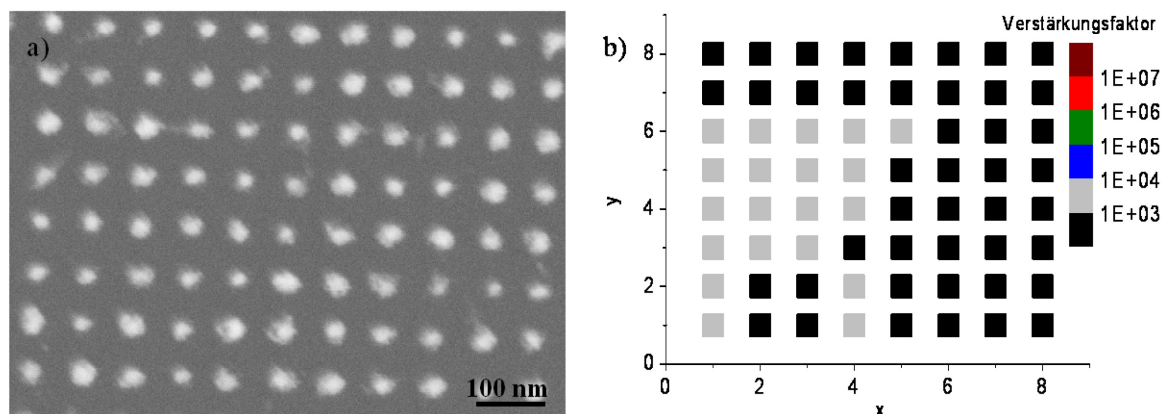


Abbildung 6-1: a) REM-Aufnahme eines elektronenstrahlolithographisch hergestellten Substrats mit Goldzylindern (Höhe: 40 nm, Abstand: 70 nm) auf einem Siliziumwafer und b) Schematische Verteilung des Verstärkungsfaktors in Abhängigkeit der Position (x, y). Die Verstärkungsfaktoren wurden mit  $1 \cdot 10^{-5}$  M Kristallviolett als Analyt bestimmt. Die SERS-Spektren wurden in einem Abstand von  $10 \mu\text{m}$  aufgenommen ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ , Intensität:  $2,7 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 1 s) und der Durchmesser der Messpunkte betrug  $1,5 \mu\text{m}$  (nicht skaliert in der Darstellung).

Wie in Abbildung 6-1 a ersichtlich, ist der Abstand zwischen den Nanozylindern mit 70 nm sehr groß, deutlich größer als bei den immobilisierten Goldnanopartikeln (Vergleich Abbildung 5-5 e). Die Strukturen sind damit vergleichbar mit isolierten Nanostrukturen. Der recht weite Abstand ist auf das Herstellungsverfahren zurückzuführen und ist der Kleinstmögliche, der hier erreicht werden kann. Durch die Streuung von Elektronen innerhalb der im Herstellungsprozess verwendeten Polymermatrix (Abschnitt 3.4) und an dem darunter befindlichen Siliziumwafer, kommt es zu einer Aufweitung des Primärstrahls<sup>[119]</sup>. Dadurch ist der Bereich, der vom Elektronenstrahl beeinflusst wird, größer als die Breite des Elektronenstrahls.

Die Strukturen sind sehr gleichmäßig angeordnet (Abbildung 6-1 a). Mit den Substraten wird ein mittlerer Verstärkungsfaktor von  $5 \cdot 10^2$  erreicht (Abbildung 6-1 b). Dieser Verstärkungsfaktor ist in guter Übereinstimmung mit der für Einzelpartikel theoretisch vorhergesagten Verstärkung<sup>[5,57]</sup> und der, die für einzelne Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel in Lösung gefunden wurde<sup>[191]</sup> (Abbildung 4-7 und Tabelle 4-3 in Kapitel 4.3). Wie die Kartierung des Verstärkungsfaktors in Abbildung 6-1 b zeigt, ist dessen mikroskopische Homogenität auf den elektronenstrahlolithographisch hergestellten Oberflächen etwas geringer, als auf den mit Organosilan-immobilisierten Goldnanopartikelflächen (Vergleich Abbildung 5-6 und Abbildung 6-1 b). Dies könnte in der Unterteilung der

100 x 100  $\mu\text{m}^2$ -Fläche in vier einzelne Flächen begründet sein, die jeweils durch eine Lücke von einigen Mikrometern getrennt sind. Daraus resultierend kann die Anzahl von Nanostrukturen im Fokus variieren.

Sind Nanostrukturen auf Oberflächen angeordnet, so wird unter Einfluss des, um die Nanostrukturen induzierten Feldes, auch ein Dipol in seiner Unterlage erzeugt, der ein Abbild des induzierten Dipols in der Nanostruktur ist<sup>[192,193]</sup>. Durch Wechselwirkung der beiden Dipolfelder kommt es zu einer Änderung des elektrischen Feldes um die Nanostrukturen. Da die Größe, des in der Oberfläche induzierten Dipolmoments, von der Dielektrizitätskonstante des Materials, auf dem sich die Nanostrukturen befinden, abhängt, hat das Material der Unterlage einen Einfluss auf das lokale Feld der Nanostruktur<sup>[192,193]</sup>. Um den Einfluss des Materials der Unterlage auf die Verstärkung der elektronenstrahlolithographisch hergestellten Substrate zu untersuchen, wurde vor dem Aufbringen der Goldschicht eine 100 nm dicke Siliziumdioxidschicht ( $\text{SiO}_2$ -Schicht) auf dem Siliziumwafer erzeugt. Die Goldnanostrukturen sind, wie auf dem reinen Siliziumwafer, gleichmäßig angeordnet (Abbildung 6-2 a). Mit den so hergestellten Substraten wird ein mittlerer Verstärkungsfaktor von  $6 \cdot 10^3$  erreicht (Abbildung 6-2 b). Diese Verstärkung ist um den Faktor 10 höher als mit den Nanostrukturen auf dem reinen Siliziumwafer (Vergleich Abbildung 6-1). Die Berechnungen mittels finiter Differenzen-Methode (*finite difference time domain*, FDTD) der elektrischen Feldintensitäten bestätigen diese Beobachtungen (Abbildung 6-3). Die Simulationen zeigen, dass höhere Intensitäten erreicht werden und die Felder sich stärker überlagern, wenn sich auf dem Siliziumwafer eine  $\text{SiO}_2$ -Schicht befindet (Abbildung 6-3).

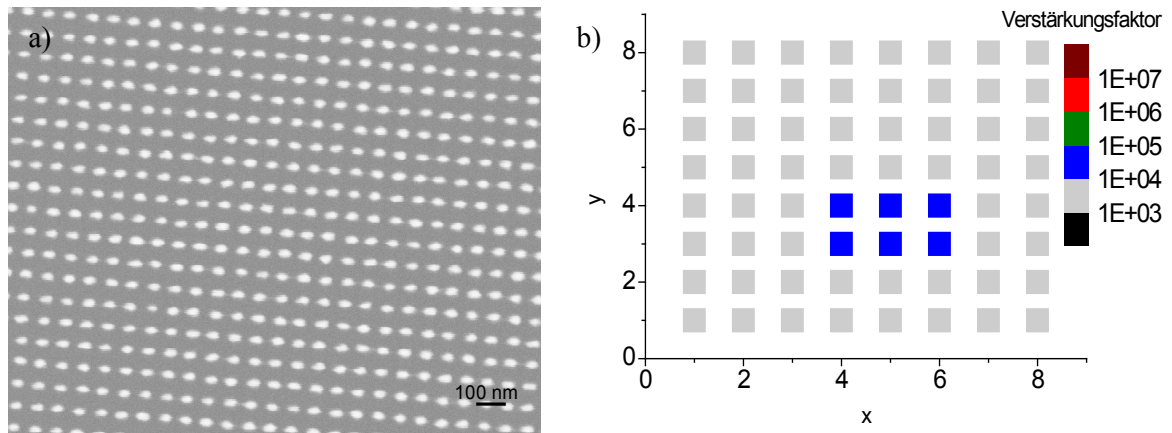


Abbildung 6-2: a) REM-Aufnahme eines elektronenstrahlolithographisch hergestellten Substrats mit Goldzylindern (Höhe: 40 nm, Abstand: 70 nm) auf einem Siliziumwafer mit SiO<sub>2</sub>-Schicht (100 nm) und b) Schematische Verteilung des Verstärkungsfaktors in Abhängigkeit der Position (x, y). Die Verstärkungsfaktoren wurden mit  $1 \cdot 10^{-5}$  M Kristallviolett als Analyt bestimmt. Die SERS-Spektren wurden in einem Abstand von 10  $\mu\text{m}$  aufgenommen ( $\lambda = 633$  nm, Intensität:  $2,7 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 1 s) und der Durchmesser der Messpunkte betrug 1,5  $\mu\text{m}$  (nicht skaliert in der Darstellung).

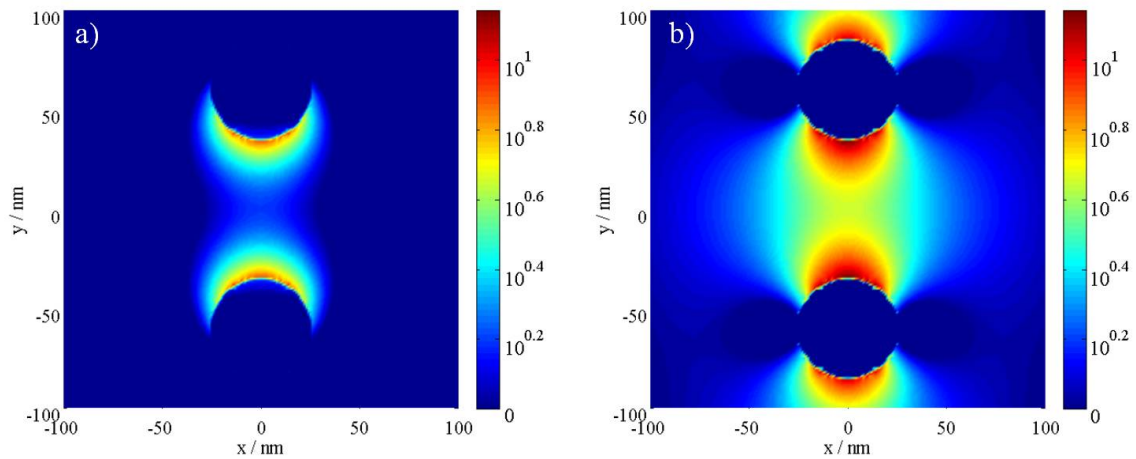


Abbildung 6-3: Verteilung der elektrischen Feldintensität von Goldzylinderdimeren (Höhe: 50 nm, Abstand: 70 nm) auf a) einer Siliziumschiicht (100 nm) und b) einer Siliziumdioxidschicht (100 nm). Die Verteilung der Feldintensität wurde über FDTD-Berechnungen bestimmt. Es wurde eine Intensität des Anregungsfeldes von 1 gewählt, sodass das erhaltene Feld der Feldverstärkung durch die Nanostrukturen entspricht. Wie in Gleichung 1 entspricht die Verstärkung im SERS-Experiment ungefähr dem Quadrat der Feldintensität, da sowohl das Anregungsfeld, als auch das gestreute Feld verstärkt werden, wenn die Frequenz der Felder in Resonanz zur Plasmonenresonanz steht (siehe Kapitel 1).

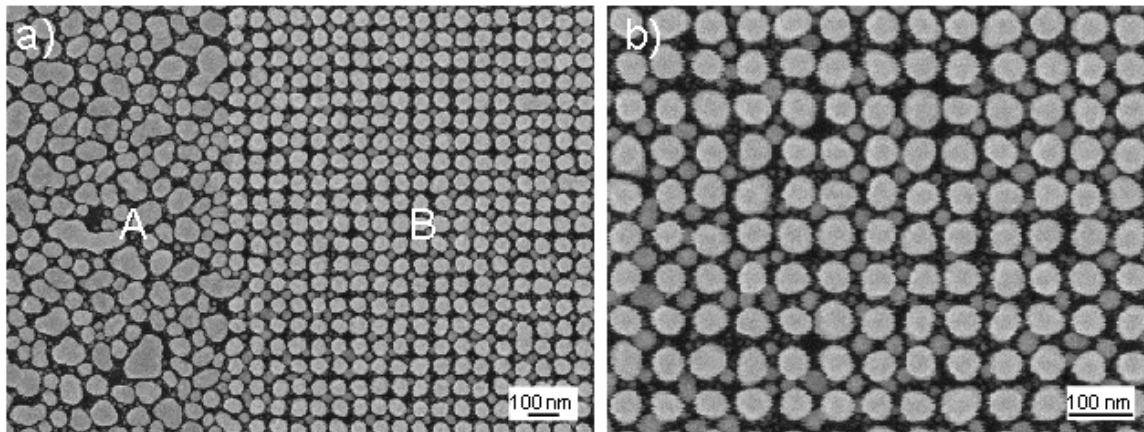


Abbildung 6-4: REM-Aufnahmen einer elektronenstrahlolithographisch hergestellten Oberfläche mit Goldzylindern (Bereich B, Höhe und Durchmesser der Primärpartikel: 40 nm), die mit 36 nm zusätzlichem Gold bedampft wurde. In b) ist ein Ausschnitt der Aufnahme in a) dargestellt. Der Ausschnitt stammt aus dem vorstrukturierten Bereich, der in a) mit B markiert ist.

Um die elektronenstrahlolithographisch hergestellten Substrate mit den immobilisierten Nanopartikeln vergleichen zu können, musste der Abstand zwischen den Partikeln verringert werden. Dazu wurden Substrate mit 30 nm hohen Goldzylindern mit einem Abstand von 70 nm hergestellt, die anschließend in mehreren Schritten mit Gold bedampft und zwischen den einzelnen Bedampfungsschritten geheizt wurden. Raster-elektronenmikroskopieaufnahmen zeigen, dass sich dadurch der Abstand zwischen den Zylindern verringert (Vergleich Bereich B in Abbildung 6-4 a mit Abbildung 6-1 a). Neben dem Wachstum der Zylinder führt die Bedampfung auch zur Bildung neuer, kleiner Partikel im Zwischenraum der Zylinder (Abbildung 6-4 b). Außerhalb der vorstrukturierten Bereiche läuft der Goldfilm zu unstrukturierten Inseln zusammen (Abbildung 6-4 a, Bereich A). In den vorstrukturierten Bereichen werden Verstärkungsfaktoren von  $2 \cdot 10^6$  (Abbildung 6-5 a, Bereich B in Abbildung 6-4) und außerhalb der vorstrukturierten Bereiche von  $8 \cdot 10^5$  (Abbildung 6-5 b, Bereich A in Abbildung 6-4) erreicht. Diese Verstärkungsfaktoren sind in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur für Silberinselfilme beschriebenen Verstärkungsfaktoren von  $10^4 - 10^6$  [73,97,100] und mit theoretisch vorhergesagten Werten von  $3 \cdot 10^6$  [42].

Im Bereich der Goldzylinder weisen die Substrate eine hohe Homogenität auf mikroskopischer Ebene auf (Abbildung 6-5 a), während in den Bereichen außerhalb die Homogenität, aufgrund der ungeordneten Strukturen, wesentlich geringer ist (Abbildung 6-5 b). Dies zeigt, dass die Vorstrukturierung in einer höheren mikroskopischen Homo-



genität der Substrate im Vergleich zu herkömmlichen Inselfilmen resultiert. Die Verstärkung ist vergleichbar mit derjenigen, welche mit den organosilan-immobilisierten Goldnanopartikeln erreicht wurde (Vergleich mit Abbildung 5-6).

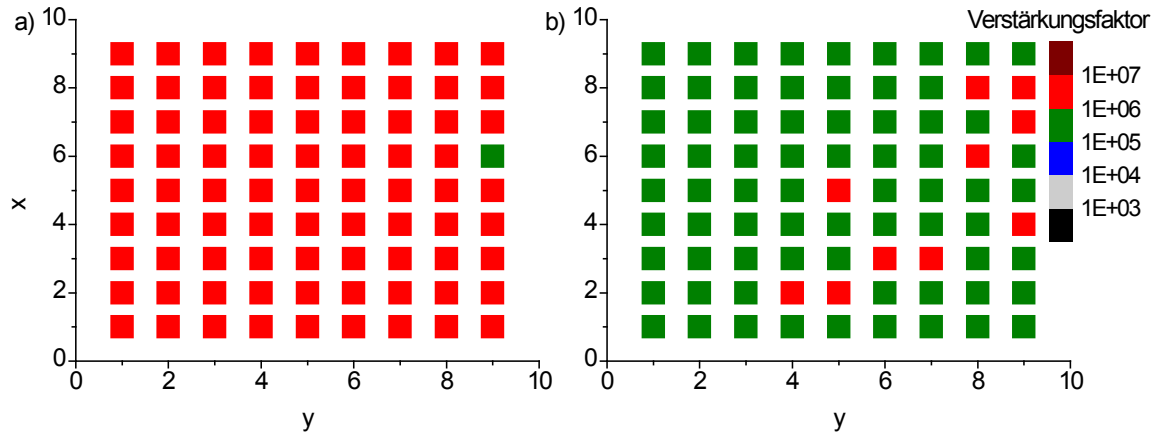


Abbildung 6-5: Schematische Verteilung des Verstärkungsfaktors in Abhängigkeit der Position (x, y) auf einem mittels Elektronenstrahlolithographie hergestellten Goldsubstrat, das zusätzlich mit Gold bedampft wurde (Abbildung 6-4) a) im Bereich der Goldzylinder (Fläche B in Abbildung 6-4 a) und b) außerhalb des vorstrukturierten Bereichs (Fläche A in Abbildung 6-4 a). Die Verstärkungsfaktoren wurden mit  $5 \cdot 10^{-5}$  M Kristallviolett als Analyt ( $\lambda = 633$  nm, Intensität:  $2,7 \cdot 10^4$  W·cm $^{-2}$ , 1 s) bestimmt. Die SERS-Spektren wurden in einem Abstand von 10  $\mu$ m aufgenommen und der Durchmesser Messpunkte betrug 1,5  $\mu$ m (nicht skaliert in der Darstellung).

Bei der Betrachtung der SERS-Verstärkung der mit zusätzlichem Gold bedampften, vorstrukturierten Zylinderarrays, müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden. Die Bedampfung führt neben einer Verringerung des Abstands zwischen den Partikeln auch zu einer Vergrößerung der Höhe und der Durchmesser der Zylinder. Wie Ergebnisse mit Inselfilmen zeigen<sup>86, 173</sup> hängt die Intensität der Raman-Signale von der Abscheidungsrate und der Dicke der Filme ab. Ein solcher Effekt könnte auch bei der Bedampfung von lithographisch hergestellten Partikeln zum Tragen kommen. Neben der Veränderung von Größe und Form der primären Partikel, können, als weiterer Faktor durch den Bedampfungsprozess zusätzliche, kleinere Partikel zwischen den lithographisch definierten Strukturen entstehen.

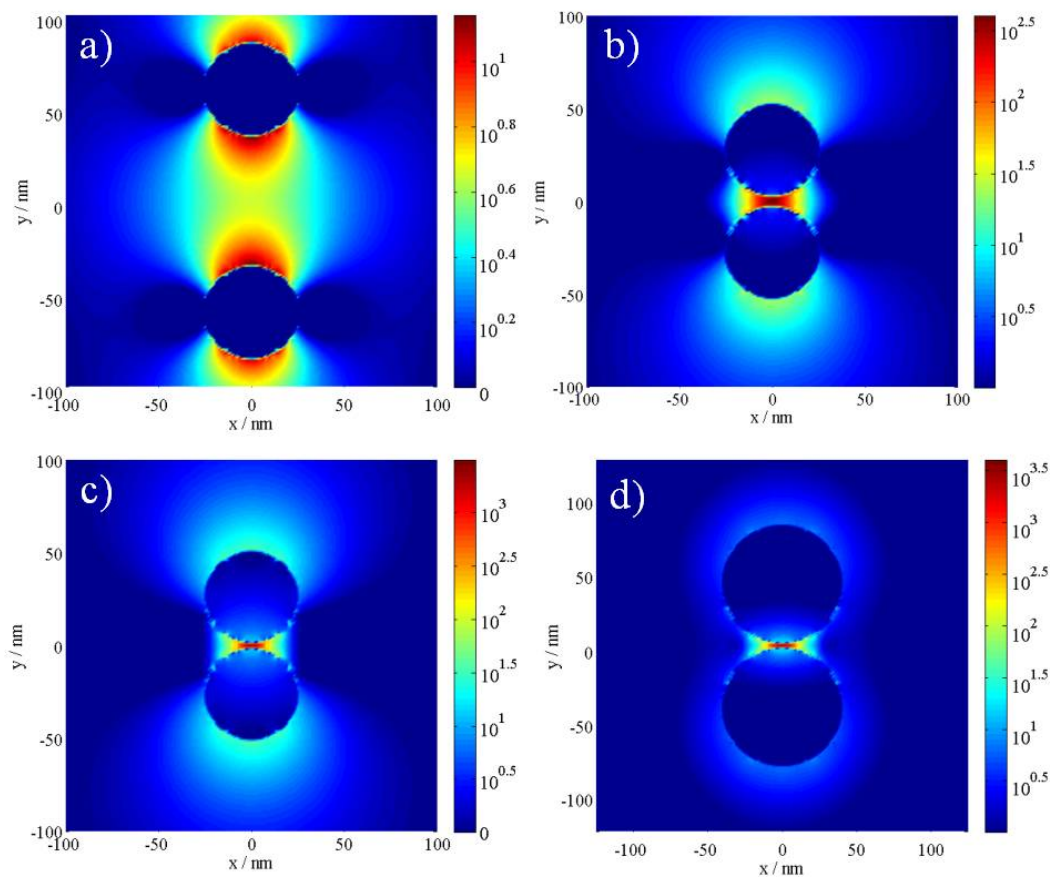


Abbildung 6-6: Verteilung der elektrischen Feldintensität von Goldzylinderdimeren mit unterschiedlichen Höhen  $h$ , Durchmessern  $d$  und Abständen  $a$  auf einer Siliziumdioxidschicht (100 nm): a)  $h = 50$  nm,  $d = 50$  nm,  $a = 70$  nm, b)  $h = 50$  nm,  $d = 50$  nm,  $a = 5$  nm, c)  $h = 50$  nm,  $d = 50$  nm,  $a = 2$  nm, d)  $h = 80$  nm,  $d = 80$  nm,  $a = 2$  nm. Die Verteilung der Feldintensität wurde über FDTD-Berechnungen bestimmt. Es wurde eine Intensität des Anregungsfeldes von 1 gewählt, sodass das erhaltene Feld der Feldverstärkung durch die Nanostrukturen entspricht. Wie in Gleichung 1 entspricht die Verstärkung im SERS-Experiment ungefähr dem Quadrat der Feldintensität, da sowohl das Anregungsfeld, als auch das gestreute Feld verstärkt werden, wenn die Frequenz der Felder in Resonanz zur Plasmonenresonanz steht (siehe Kapitel 1).

Der Einfluss von Abstand und Größe der Partikel wurde zunächst in FDTD-Rechnungen betrachtet. Abbildung 6-6 zeigt die Verteilung der Feldintensität für Goldzylinderdimere mit unterschiedlichen Höhen, Durchmessern und Abständen. Je kleiner der Abstand zwischen den Partikeln (Vergleich Abbildung 6-6 a-c) und je größer der Durchmesser und die Höhe der Partikel (Vergleich Abbildung 6-6 c und d) ist, desto größer ist auch die Intensität des elektrischen Feldes. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abschnitt 4.3, wo eine Zunahme der Verstärkung mit zunehmender Größe von Goldnanopartikeln in Lösung beobachtet wurde.

Der Einfluss von Durchmesser und Abstand der Primärpartikel und der Dicke der Bedampfungsschicht wurden nun im Experiment untersucht. Dazu wurden Nanopartikelarrays mit Goldzylindern hergestellt, die unterschiedliche Durchmesser, Höhen und Abstände aufwiesen. Diese Substrate wurden zusätzlich mit Gold in unterschiedlichen Schichtdicken bedampft.

In Tabelle 6-1 sind die Verstärkungsfaktoren für vier Nanopartikelarrays (a-d), die sich in der Höhe der Primärpartikel und der Bedampfungsschicht unterscheiden, und die jeweils in Bereiche mit unterschiedlichen Durchmessern und Abstände der Nanostrukturen unterteilt waren, zusammengefasst. Wie daraus hervorgeht, sind die Ergebnisse sehr ähnlich und unterscheiden sich hauptsächlich für verschiedene Anfangshöhen und Bedampfungsdicken. Es wurden Verstärkungsfaktoren zwischen  $2 \cdot 10^5$  für 27 nm hohe Zylinder, die mit einer 40 nm-dicken Goldschicht bedampft wurden (Tabelle 6-1 b) und  $4 \cdot 10^6$  für 30 nm hohe Zylinder, die mit einer 24 nm-dicken Goldschicht bedampft wurden (Tabelle 6-1 c), erhalten. Die Ergebnisse zeigen also keine Unterschiede im Verstärkungsfaktor in Abhängigkeit des Abstands der Primärpartikel und des Durchmessers. Das lässt darauf schließen, dass die Verstärkung durch die kleineren Nanopartikeln, die sich zwischen den großen Nanostrukturen gebildet haben, bestimmt wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass durch die Überlagerung der Felder von kleinen und großen Partikeln lokal sehr hohe Felder entstehen können<sup>[35,144]</sup>. Die Bildung zusätzlicher, kleiner Nanostrukturen in der elektronenstrahlolithographischen Partikelanordnung ist in Abbildung 6-5 a deutlich zu erkennen. Sie wurden in weiteren Simulationen berücksichtigt. Abbildung 6-7 vergleicht einen Ausschnitt aus einer Anordnung 50 nm großer Partikel ohne (Abbildung 6-7 a) und mit (Abbildung 6-7 b) zwischengelagerten, kleineren Goldnanopartikeln. Die FDTD-Berechnungen ergeben Verstärkungen von  $10^6$  in Anwesenheit zusätzlicher, kleinerer Partikel (Abbildung 6-7). Sie bestätigen somit, dass derartige Verstärkungen mit den bedampften Nanostrukturen erreicht werden können.

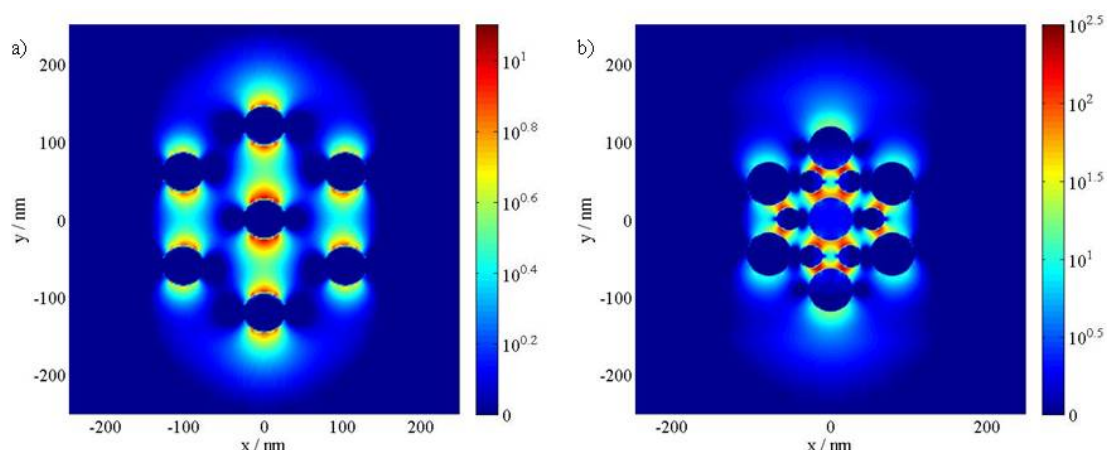


Abbildung 6-7: Verteilung der Feldintensität in Nanopartikelarrays mit a) Zylinder mit einer Höhe von 50 nm und b) Zylindern mit einer Höhe von 50 nm, in deren Zwischenräumen sich 20 nm große Goldnanopartikel befinden. Die Verteilung der Feldintensität wurde über FDTD-Berechnungen bestimmt. Es wurde eine Intensität des Anregungsfeldes von 1 gewählt, sodass das erhaltene Feld der Feldverstärkung durch die Nanostrukturen entspricht. Wie in Gleichung 1 entspricht die Verstärkung im SERS-Experiment ungefähr dem Quadrat der Feldintensität, da sowohl das Anregungsfeld, als auch das gestreute Feld verstärkt werden, wenn die Frequenz der Felder in Resonanz zur Plasmonenresonanz steht (siehe Kapitel 1).

Tabelle 6-1: Verstärkungsfaktoren für vier elektronenstrahlolithographisch hergestellte Goldpartikelarrays mit einer Höhe der Primärpartikel  $h$ , auf die zusätzliches Gold der Schichtdicke  $s$  aufgedampft wurde: a)  $h = 20$  nm,  $s = 20$  nm, b)  $h = 27$  nm,  $s = 40$  nm, c)  $h = 30$  nm,  $s = 24$  nm, d)  $h = 40$  nm,  $s = 24$  nm. Die Substrate waren in Bereiche mit unterschiedlichem Durchmesser  $d$  und variierendem Abstand zwischen den Nanostrukturen  $\Lambda$  in nm unterteilt. Die Verstärkungsfaktoren wurden mit  $1 \cdot 10^{-6}$  M Kristallviolett als Analytmolekül bestimmt ( $\lambda = 633$  nm,  $I = 1,2 \cdot 10^5$  W·cm $^{-2}$ , 1 s).

a					b				
	$\Lambda = 80$	$\Lambda = 75$	$\Lambda = 70$	$\Lambda = 65$	$\Lambda = 80$	$\Lambda = 75$	$\Lambda = 70$	$\Lambda = 65$	
d = 37 nm	$8 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	
d = 40 nm	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	
d = 42 nm	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$	
d = 47 nm	$8 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$	
c					d				
	$\Lambda = 80$	$\Lambda = 75$	$\Lambda = 70$	$\Lambda = 65$	$\Lambda = 80$	$\Lambda = 75$	$\Lambda = 70$	$\Lambda = 65$	
d = 37 nm	$3 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^5$	
d = 40 nm	$2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^5$	
d = 42 nm	$4 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$	
d = 47 nm	$3 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$9 \cdot 10^5$	$7 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^5$	

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die organosilan-immobilisierten Goldnanopartikel ähnliche Verstärkungsfaktoren liefern, wie reproduzierbar hergestellte Modellstrukturen. Wie die theoretischen Betrachtungen des Modells zeigen, setzt insbesondere

die Anwesenheit des Organosilanlinkers die prinzipiell realisierbare Verstärkung nicht herab. Im Gegensatz zu nanolithographischen Substraten, deren Herstellung technisch sehr aufwändig und kostenintensiv ist, können die organosilan-immobilisierten Nanopartikel einfach und reproduzierbar hergestellt werden.

## **7. Kombination katalytischer und plasmonischer Nanopartikel auf Oberflächen für in situ-Untersuchungen kinetischer Reaktionen mittels SERS**

Die Bestimmung von Reaktionskonstanten als Maß für die katalytische Aktivität ist ein entscheidender Schritt bei der Entwicklung und Charakterisierung neuer Katalysatoren. Der Einsatz molekülspezifischer, spektroskopischer Techniken, wie IR und Raman<sup>[194,195,196]</sup> in der Untersuchung von Reaktionen auf Oberflächen, ermöglicht die Gewinnung von Informationen über die molekulare Struktur von Zwischen- und Nebenprodukten. Speziell mit Raman-Spektroskopie können auch Reaktionen in Lösung untersucht werden, was die Methode für viele Arten von Katalysatoren anwendbar macht. Anders als ein UV/Vis-Experiment ist ein Raman-Experiment, außerhalb der elektronischen Anregung, weitgehend unabhängig von den optischen Eigenschaften der Probe. Der Vorteil von SERS bei der Untersuchung katalytischer Reaktionen sind die kurzen Messzeiten. SERS wurde bereits für *in situ*-Untersuchungen verschiedener Arten von Reaktionen auf Elektrodenoberflächen eingesetzt<sup>[197,198]</sup>. Dazu zählt z.B. die Detektion von Reaktionsintermediaten<sup>[199]</sup>, die Bestimmung des Einflusses vom Elektrodenpotenzial<sup>[200,201]</sup> und Untersuchungen des Elektronentransfers in Proteinen<sup>[202]</sup>. Der Einsatz in der Untersuchung von Katalysatoren und für die Bestimmung von Reaktionskonstanten blieb bisher aus. Für diese Untersuchungen sind SERS-Substrate von Vorteil, die, wie die organosilan-immobilisierten Nanopartikel, leicht und reproduzierbar hergestellt werden können und eine hohe Homogenität der Verstärkung aufweisen.

Für die Bestimmung der katalytischen Aktivität verschiedener Katalysatoren wurde als Modellreaktion die Reduktion von *p*-Nitrothiophenol (PNTp) zu *p*-Aminothiophenol (PATp) mit Natriumborhydrid gewählt (Abbildung 7-1). Die analoge Reaktion von Nitrophenol mit Natriumborhydrid zu Aminophenol wurde bereits vielfach mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht<sup>[124,203,204,205]</sup>. Der Reaktionsverlauf und die verschiedenen Einflussfaktoren sind damit weitestgehend bekannt.

### 7.1 Organosilan-immobilisierte Nanopartikel und Nanopartikelmischungen als SERS-Substrate für die Untersuchung katalytischer Reaktionen

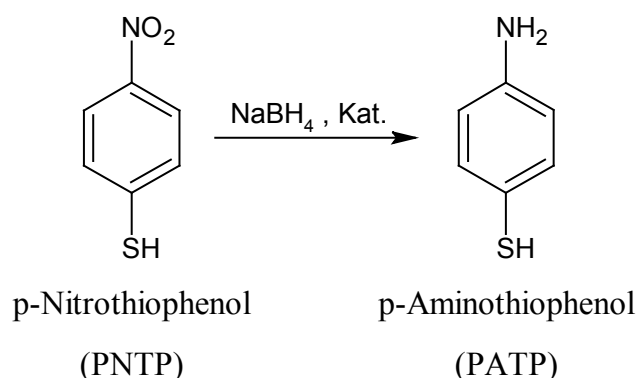


Abbildung 7-1: Schematische Darstellung der Reduktion von *p*-Nitrothiophenol zu *p*-Aminothiophenol mit Natriumborhydrid.

Für die Untersuchung metallkatalysierter Reaktionen mit SERS sind bifunktionale Metallstrukturen von Vorteil, die sowohl plasmonische Eigenschaften aufweisen und gleichzeitig als Katalysator fungieren<sup>[206]</sup>. Bei den Kompositstrukturen handelt es sich meist im Core-Shell-Nanopartikel, mit einem Kern aus Gold, der von einer dünnen Schicht aus Platin oder Palladium umgeben ist<sup>[207,208,209,210]</sup>. Obwohl die SERS-Aktivität katalytisch aktiver Kompositnanostrukturen bereits mehrfach anhand von Testmolekülen gezeigt werden konnte<sup>[207,208,211]</sup>, gibt es nur wenige Arbeiten, in denen die Strukturen für die Beobachtung katalytischer Reaktionen mittels SERS eingesetzt wurden<sup>[209,210]</sup>.

Wie bereits in Kapitel 5.4 am Beispiel der gemischten Gold-Silber-Substrate gezeigt, lassen sich durch die Immobilisierung von Nanostrukturen mit Organosilanen, sehr einfach Oberflächen mit Mischungen verschiedener Metallnanopartikel herstellen. Für die Herstellung von Substraten, die sowohl katalytische als auch SERS-Aktivität aufweisen, wurden 40 nm große Gold- und 2 nm große Platinnanopartikel mittels 3-Aminopropyltriethoxysilan simultan auf einer Glasoberfläche immobilisiert. Dieser Ansatz unterscheidet sich von den bisher verwendeten Kompositstrukturen aus Gold und Platin<sup>[207,208,209]</sup> bzw. Palladium<sup>[210]</sup> durch die Einfachheit der Herstellung, die erhöhte Stabilität gegenüber analyt-induzierter Aggregation und der größeren strukturellen Vielfalt und damit Anwendbarkeit.

Die Nanostruktur und die mit Kristallviolett bestimmten Verstärkungsfaktoren der gemischten Oberflächen mit Gold- und Platinnanopartikeln sind in Abbildung 7-2 dargestellt. Die Oberflächen weisen eine hohe und auf mikroskopischer Ebene homogen verteilte SERS-Aktivität mit Verstärkungsfaktoren von  $4 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^5$  auf (Abbildung 7-2 a). Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen zeigen, dass die Goldnanopartikel gleichmäßig auf den Oberflächen angeordnet sind (Abbildung 7-2 b). Der Verstärkungsfaktor liegt mit  $\sim 10^6$  im Bereich der reinen Goldsubstrate (Vergleich Abbildung 5-6 d und Abbildung 7-2 a), d.h. dass die zusätzlich auf den Oberflächen immobilisierten Platinnanopartikel nicht zu einer Abnahme der SERS-Verstärkung führen. Dies ist ein weiterer Vorteil der immobilisierten Nanostrukturen im Vergleich zu Kompositstrukturen, da in den Kompositstrukturen mit zunehmender Schichtdicke des katalytisch aktiven Materials die SERS-Verstärkung abnimmt<sup>[18,207,212]</sup>.

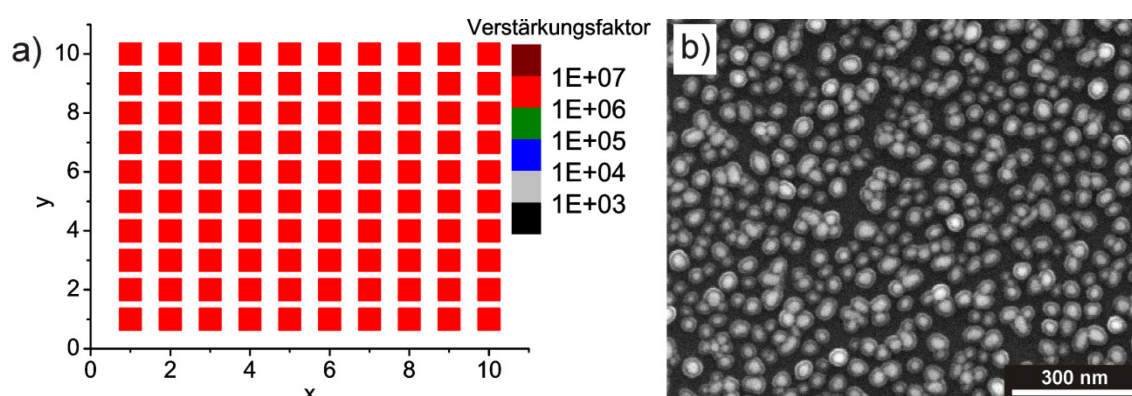


Abbildung 7-2: a) Schematische Verteilung des Verstärkungsfaktors in Abhängigkeit von der Position (x, y) und b) REM-Aufnahme eines Substrats mit simultan immobilisierten, Citrat-stabilisierten Gold- und Platinnanopartikeln. Die Verstärkungsfaktoren wurden mit  $5 \cdot 10^{-6}$  M Kristallviolett als Analyt ( $\lambda = 633$  nm, Intensität:  $8,5 \cdot 10^3$  W·cm<sup>-2</sup>, 1 s) bestimmt. Die SERS-Spektren wurden in einem Abstand von 10  $\mu$ m aufgenommen und der Durchmesser der Messpunkte betrug 1,5  $\mu$ m (nicht skaliert in der Darstellung).

Werden Metallnanopartikel als Katalysator für die Reduktion von Nitrophenol verwendet, so läuft die Reduktion an der Oberfläche der Metallnanopartikel ab<sup>[203,204]</sup>. Die Borhydridionen reagieren mit dem Metall unter Bildung eines Metallhydrids. Im nächsten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt kommt es zur Reduktion des ebenfalls an der Oberfläche adsorbierten Nitrophenols.

Damit eine Detektion der Reaktion mittels SERS möglich ist, müssen sich die Moleküle und die Platinnanopartikel im lokalen optischen Feld der Goldnanopartikel befinden. In



Abbildung 7-3 sind Rastertunnelmikroskopieaufnahmen (STM) von 40 nm großen Gold- und 2 nm großen Platinnanopartikeln auf hochorientiertem pyrolytischem Graphit (HOPG) dargestellt. Sie zeigen Aggregate aus Goldnanopartikeln, an die kleinere Partikel angelagert sind. Aus der Größe der kleineren Partikel kann man schließen, dass es sich dabei um Platinnanopartikel handelt. Diese sind nicht fest an die Goldoberflächen gebunden und können leicht durch die STM-Spitze bewegt werden.

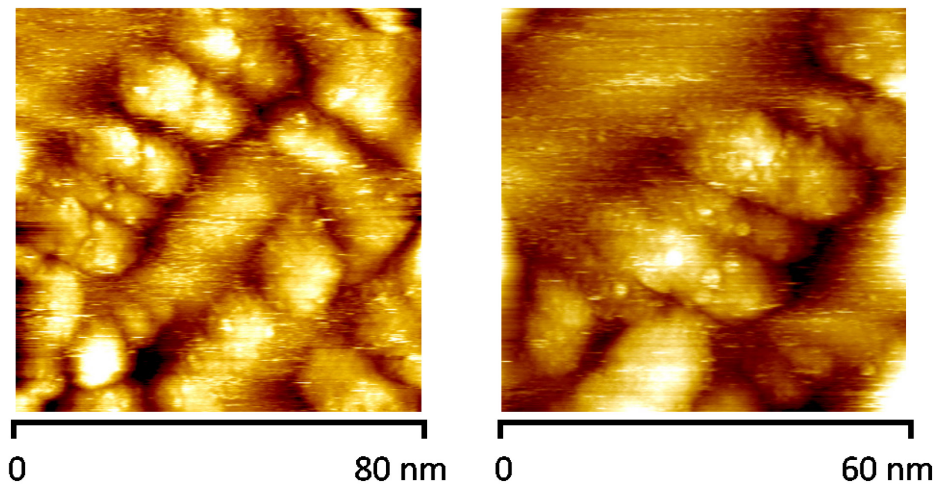


Abbildung 7-3: STM-Aufnahmen von Citrat-stabilisierten Gold- und Platinnanopartikeln auf HOPG-Substraten auf Flächen von  $80 \times 80 \text{ nm}^2$  bzw.  $60 \times 60 \text{ nm}^2$ .

Aus der Literatur ist bekannt, dass Gold- und Silbernanopartikel als Katalysatoren für die Reduktion von aromatischen Verbindungen eingesetzt werden können<sup>[204], 163, 165</sup>. Dabei ist die katalytische Aktivität abhängig von der Größe, Form und den Oberflächeneigenschaften der Partikel<sup>[213,214]</sup>. Für die Untersuchung der Aktivität von Katalysatoren in Lösung mit SERS werden plasmonische Oberflächen benötigt, die keine eigene katalytische Aktivität besitzen.

In Abbildung 7-4 sind SERS-Spektren von PATP und PNTP auf Oberflächen mit Citrat-stabilisierten Gold- und Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikel dargestellt. Die SERS-Spektren weisen charakteristische und intensive Banden von PATP und PNTP auf. Die Spektren, die mit den Gold- und Silbernanopartikeln aufgenommen wurden, unterscheiden sich kaum (Vergleich Abbildung 7-4 a und b). Dies in guter Übereinstimmung mit bereits bekannten Arbeiten<sup>[163,164,215]</sup>. Die Spektren von PNTP (schwarze Spektren in Abbildung 7-4) und PATP (rote Spektren in Abbildung 7-4) sind gut unterscheidbar und die Banden überlagern größtenteils nicht. Eine Ausnahme bildet die Bande bei

$\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$ , die der C-S-Streckschwingung des PATP<sup>[164]</sup> und der C-H-Biegeschwingung des PNTP<sup>[215]</sup> zugeordnet werden kann.

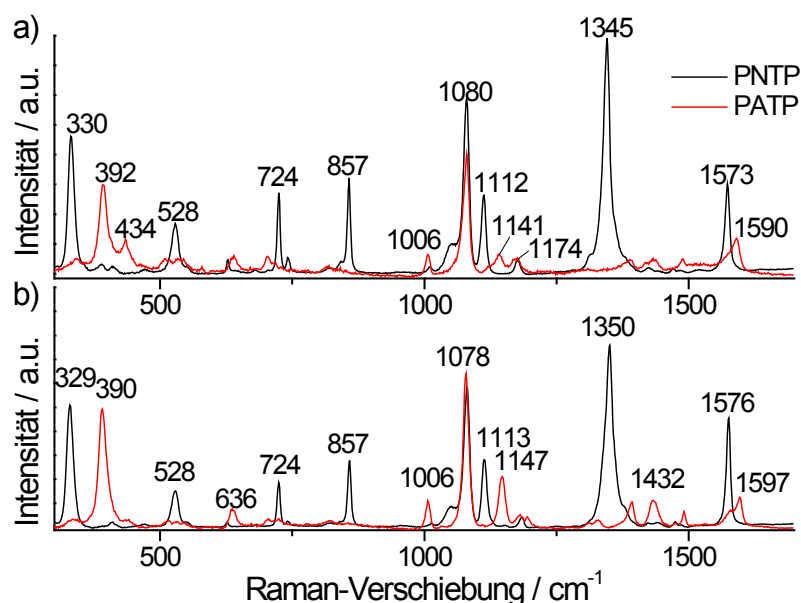


Abbildung 7-4: SERS-Spektren von PNTP und PATP (jeweils  $10^{-4} \text{ M}$ ) auf a) Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln und b) Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln, die jeweils mit APTES immobilisiert wurden ( $\lambda = 785 \text{ nm}$ ,  $I = 4,8 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $1 \text{ s}$ ).

Zur Überprüfung der katalytischen Aktivität der verwendeten Citrat-stabilisierten Gold- und Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikel wurden Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen die Intensität der SERS-Signale von immobilisierten und PNTP funktionalisierten Gold- und Silbernanopartikeln nach Zugabe von Natriumborhydrid ohne Zugabe eines weiteren Katalysators über einen Zeitraum von 25 Minuten untersucht wurden. Hier konnte eine Abnahme der Intensität im Falle der Silbernanopartikel beobachtet werden (Spektren nicht gezeigt). Dies weist auf eine katalytische Aktivität der Silbernanopartikel hin, die sie für die Bestimmung der katalytischen Aktivität anderer Katalysatoren ungeeignet macht. Bei den Goldnanopartikeln blieb die Intensität konstant. Die Goldnanopartikel zeigten demzufolge keine katalytische Aktivität im betrachteten Zeitraum und wurden für die Untersuchungen eingesetzt.

## 7.2 Wahl eines geeigneten internen Standards

Liegt Natriumborhydrid während der Reaktion im Überschuss vor, hängt die Geschwindigkeit der Reduktion des PNTP nur von der PNTP-Konzentration ab. Für die Bestimmung von Reaktionskonstanten muss diese also im Experiment quantifiziert werden. Für die Quantifizierung in SERS-, aber auch in normalen Raman-Experimenten, wird meist ein interner Standard verwendet<sup>[37,216,217]</sup>. Diese Methode hat den Vorteil, dass Intensitätsschwankungen, die aus Schwankungen in der Laserintensität und der Fokussierung resultieren, die Quantifizierung nicht beeinflussen. In unserem spezifischen Experiment muss der interne Standard folgende Kriterien erfüllen:

- 1) Intensives SERS-Spektrum bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm
- 2) Keine Überlagerung der Signale mit denen des PNTP.
- 3) Keine Reduktion mit Natriumborhydrid.
- 4) Ähnliche Wechselwirkung mit der Nanopartikeloberfläche wie das PNTP, da dann von einem ähnlichen Verstärkungsmechanismus ausgegangen werden kann<sup>[218]</sup>.

Es wurden drei verschiedene Moleküle als interne Standards getestet (Nilblau, Acridin Orange und 2-Naphtalenthiole (2-NT)). Die intensiven SERS-Spektren mit charakteristischen Banden, die bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm aufgenommen wurden, sind in Abbildung 7-5 dargestellt. Somit ist das erste Kriterium für alle getesteten Moleküle erfüllt. Beim Vergleich mit den Spektren von PNTP ist ersichtlich, dass die Banden der potentiellen Standards nicht mit denen des PNTP überlappen, siehe Abbildung 7-6 für das Beispiel 2-NT.

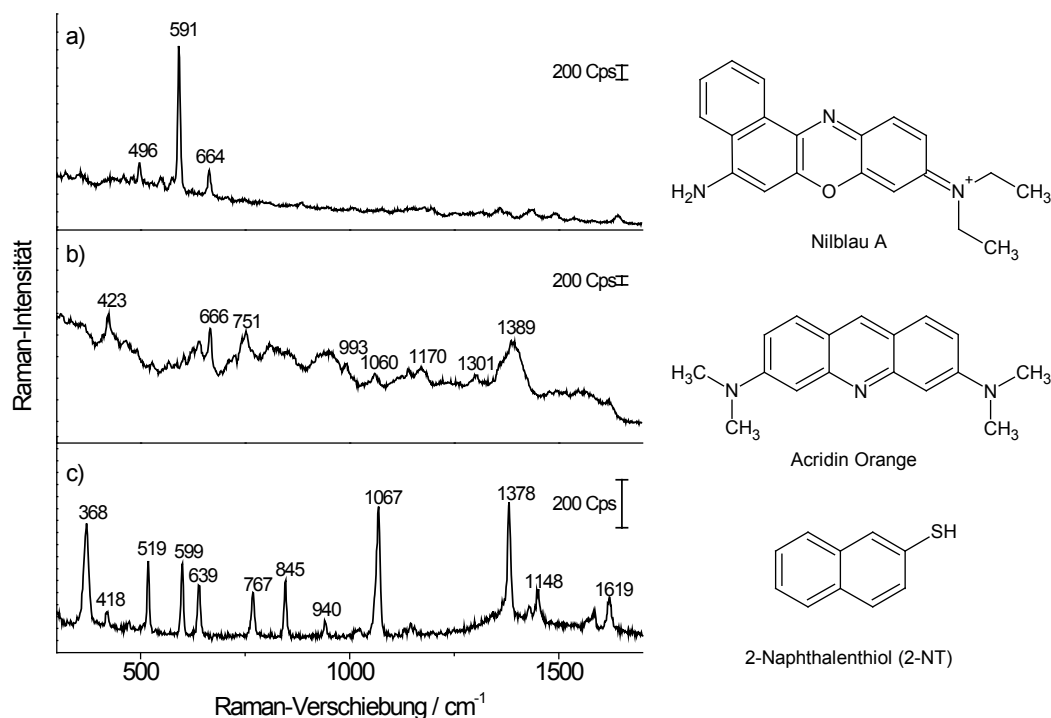


Abbildung 7-5: Strukturformeln und SERS-Spektren von a)  $10^{-4} \text{ M}$  Nilblau, b)  $10^{-4} \text{ M}$  Acridin Orange, c)  $10^{-4} \text{ M}$  2-Naphtalenthio auf immobilisierten, Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln (Linker: APTES) ( $\lambda = 785 \text{ nm}$ ,  $I = 4,8 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $1 \text{ s}$ ).

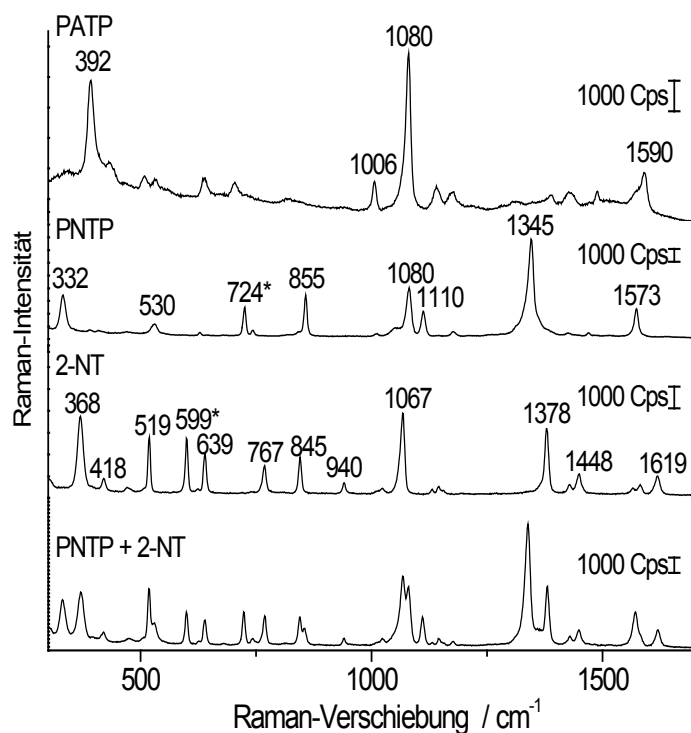


Abbildung 7-6: Vergleich der SERS-Spektren von PNTP, PATP und 2-NT (jeweils  $10^{-4} \text{ M}$ ) auf immobilisierten Goldnanopartikeln (Linker: APTES) ( $\lambda = 785 \text{ nm}$ ,  $I = 4,8 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $1 \text{ s}$ ). Die mit Stern markierten Banden werden später für die relative Quantifizierung verwendet (siehe Abschnitt 7.3).

Die Stabilität der internen Standards gegenüber Natriumborhydrid wurde anhand von UV/Vis-Messungen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7-7 gezeigt. In allen Spektren waren nach Zugabe von Natriumborhydrid Veränderungen zu erkennen. Beim Nilblau (Abbildung 7-7 a) und Acridin Orange (Abbildung 7-7 b) weisen diese Veränderungen auf eine Instabilität gegenüber Natriumborhydrid hin, sodass diese Moleküle nicht als interne Standards geeignet sind. Beim 2-NT (Abbildung 7-7 c) hingegen kann die spektrale Änderung auf eine Veränderung des pH-Werts zurückgeführt werden. Dies konnte in Experimenten mit Natriumhydroxid bestätigt werden (Spektren hier nicht gezeigt). Ansonsten konnten keine spektralen Veränderungen beobachtet werden. Es wurden ebenso Platinnanopartikel hinzugefügt, um die Bedingungen im anschließenden Katalyse-Experiment nachzuprüfen.

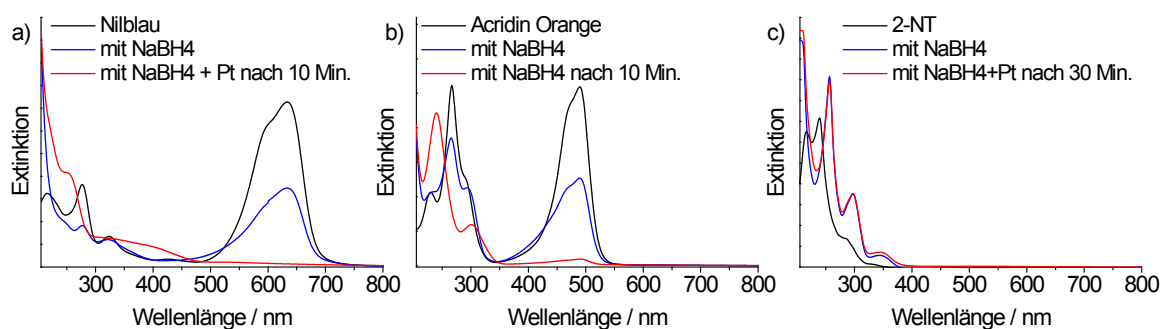


Abbildung 7-7: Extinktionsspektren von a)  $10^{-4}$  M Nilblau, b)  $10^{-5}$  M Acridin Orange und c)  $10^{-4}$  M 2-Naphtalenthiole vor und nach Zugabe von Natriumborhydrid und Katalysator (Platinnanopartikel).

Durch die Anwesenheit eines Katalysators könnte die Stabilität des internen Standards zusätzlich beeinträchtigt werden. Die Stabilität von 2-NT gegenüber der katalytischen Reduktion mit Natriumborhydrid wurde außerdem durch SERS-Messungen bestätigt. Auch hier konnten über einen Zeitraum von 30 Minuten keine Änderungen im Spektrum beobachtet werden. 2-NT ist somit potentiell als interner Standard geeignet.

Hauptvoraussetzung für eine Quantifizierung ist, wie bereits in Kapitel 5.3 diskutiert, eine Reproduzierbarkeit des Signals, unabhängig vom Messpunkt auf dem Substrat, und möglichst unabhängig von einem individuellen Substrat. Es wurden mehrere gleichartig hergestellte Goldnanopartikelsubstrate mit einer 1:1-Mischung von PNTp und 2-NT funktionalisiert. Nach der Funktionalisierung wurden an fünf Stellen auf den Substraten auf einer Fläche von jeweils  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  im Abstand von  $10 \mu\text{m}$  SERS-Spektren aufgenommen und das Bandenverhältnis verschiedener Banden von PNTp und 2-NT

ermittelt. Das Bandenverhältnis der Bande von PNTP bei  $724\text{ cm}^{-1}$ , die der C-S-Streckschwingung zugeordnet werden kann<sup>[215]</sup> und der Ringatemschwingungsbande von 2-NT<sup>[219]</sup> bei  $599\text{ cm}^{-1}$  (mit Stern markiert in Abbildung 7-6), wies eine gute Reproduzierbarkeit auf. Die relative Standardabweichung betrug ca. 5 % zwischen fünf unterschiedlichen Stellen (500 Spektren) auf einem Substrat und lag zwischen 0,7 und 10,5 % bei der Bestimmung auf drei identisch hergestellten Substraten (1500 Spektren). Die geringe Standardabweichung zeigt erneut die, in Abschnitt 5.1 bereits diskutierte, hohe Homogenität und Reproduzierbarkeit, die mit den Aminosilan-immobilisierten Nanopartikeln erreicht werden kann. Die geringe Variation des Bandenverhältnisses zwischen unterschiedlichen Stellen auf einem Substrat weist auf eine gleichmäßige und reproduzierbare Funktionalisierung mit PNTP und 2-NT hin, sodass 2-NT zur relativen Quantifizierung von PNTP eingesetzt werden kann.

### 7.3 Bestimmung der katalytischen Aktivität verschiedener Katalysatoren

Abbildung 7-8 zeigt SERS-Spektren, die nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zugabe von Natriumborhydrid auf ein PNTP / 2-NT-funktionalisiertes, gemischtes Substrat aus Gold- und Platinnanopartikeln aufgenommen wurden. Anfangs weisen die Spektren die charakteristischen Banden von PNTP und 2-NT auf. Nach 60 s ist eine deutliche Abnahme der Intensität der Banden des PNTPs und das Auftreten einer Bande bei  $390\text{ cm}^{-1}$ , die auf die Bildung von PATP zurückgeführt werden kann, zu beobachten (Vergleich Abbildung 7-8 und Abbildung 7-5). Die Spektren enthalten keine Banden, die auf die Entstehung von p,p'-Dimercaptoazobenzol (DMAB) hindeuten. DMAB ist eine Verbindung, die durch eine photochemische Reaktion aus PATP<sup>[220,221]</sup> bzw. PNTP<sup>[222]</sup> auf Oberflächen gebildet werden kann und häufig zum SERS-Spektrum von PATP beiträgt<sup>[223,224]</sup>.

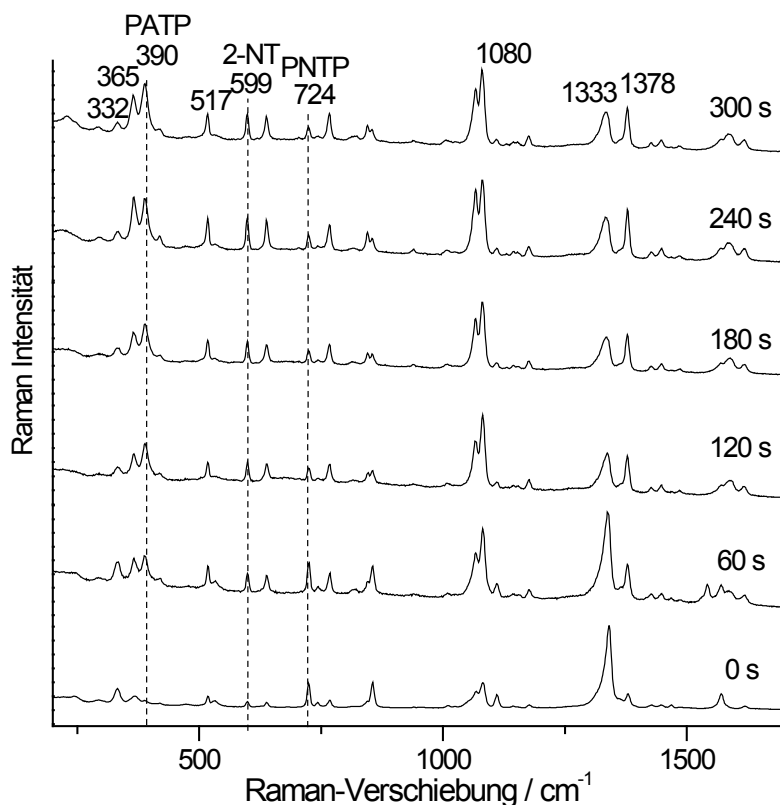


Abbildung 7-8: SERS-Spektren von PNTP und 2-NT (jeweils  $10^{-4}$  M) auf einer gemischten Oberfläche mit Gold- und Platinnanopartikeln nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Zugabe von Natriumborhydrid ( $\lambda = 785$  nm,  $I = 4,8 \cdot 10^4$  W·cm $^{-2}$ , 1 s).

In Kontrollexperimenten mit PNTP funktionalisierten Oberflächen ohne Natriumborhydrid konnten keine Änderungen in den Spektren detektiert werden, sodass eine photochemische Umwandlung von PNTP zu PATP ebenfalls ausgeschlossen werden kann. Mithilfe des Intensitätsverhältnisses der Banden bei  $724$  cm $^{-1}$  und  $599$  cm $^{-1}$  wurde die Geschwindigkeitskonstante berechnet. Da Natriumborhydrid im Überschuss verwendet wurde und sich dadurch die Konzentration während der Reaktion nur minimal ändert, konnte eine Reaktionskinetik pseudo-erster Ordnung angenommen werden<sup>[124,125,126]</sup>. Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  kann direkt aus der Steigung der logarithmischen Auftragung des Bandenverhältnisses (Abbildung 7-9) nach Gleichung 28 (siehe Abschnitt 3.10) bestimmt werden. Um einen möglichen Einfluss der Immobilisierung der Platinnanopartikel auf die Reaktionskinetik zu untersuchen, wurde zusätzlich ein Experiment durchgeführt, in dem immobilisierte und mit PNTP und 2-NT funktionalisierte Goldnanopartikel, als Oberflächen verwendet wurden. Die Platinnanopartikel wurden in diesem Experiment zusammen mit dem Natriumborhydrid als Lösung hinzugefügt, wobei die

Menge an Platinnanopartikeln dieselbe war wie in den Experimenten mit den immobilisierten Platinnanopartikeln. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7-9 b dargestellt.

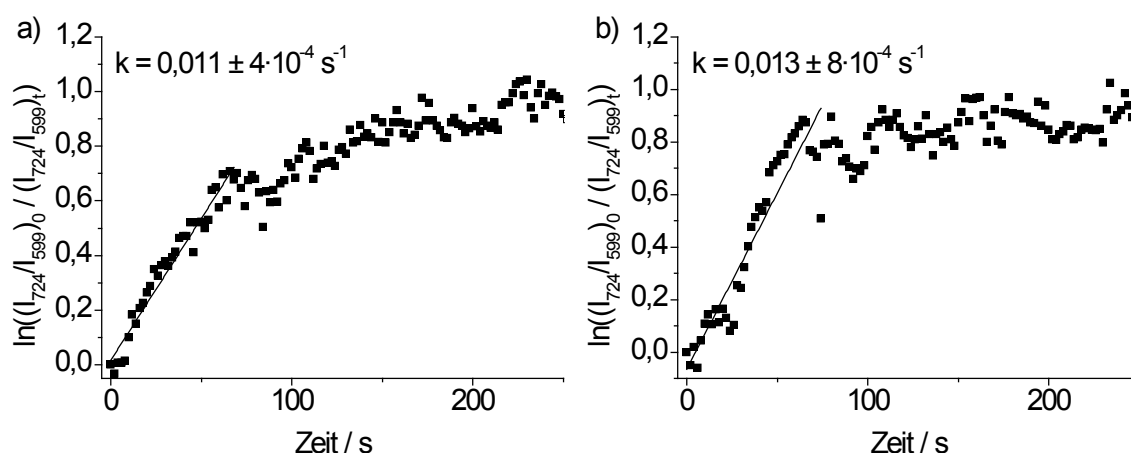


Abbildung 7-9: Pseudo-erster Ordnung-Auftragung des Intensitätsverhältnisses der Banden von PNTp und 2-NT bei 724cm<sup>-1</sup> und 599 cm<sup>-1</sup> in Abhängigkeit der Zeit für a) ein gemischtes Gold-Platin-Substrat (Linker: APTES) und b) ein Goldsubstrat (Citrat, Linker: APTES), bei dem Pt-Nanopartikel in Lösung als Katalysator verwendet wurden.

Die gute Übereinstimmung der Geschwindigkeitskonstanten, die in Experimenten, in denen die Platinnanopartikel auf den Oberflächen immobilisiert waren ( $k = 0,011 \text{ s}^{-1}$ , Abbildung 7-9 a) und den Experimenten, in denen die Platinnanopartikel in Lösung zugegeben wurden ( $k = 0,013 \text{ s}^{-1}$ , Abbildung 7-9 b), erhalten wurde, zeigt, dass die Immobilisierung keinen Einfluss auf die Reaktionskinetik hat. Aufgrund des ähnlichen Geschwindigkeitsverlaufs der Reaktion (Vergleich Abbildung 7-9 a und b), kann zudem vermutet werden, dass der Reaktionsmechanismus in beiden Fällen derselbe ist. Dies steht im Gegensatz zu früheren Arbeiten, in denen katalytisch aktive Nanopartikel in Polymermatrizes eingeschlossen wurden und eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu denselben Nanopartikeln in Lösung in Abhängigkeit von den Matrixeigenschaften beobachtet wurde<sup>[225,226]</sup>. Anders als bei diesen Arbeiten sind die Nanopartikel, die auf den Oberflächen immobilisiert sind, frei zugänglich und die Diffusion der Reaktanden ist nicht behindert. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Platinnanopartikeln in Lösung lassen darauf schließen, dass immobilisierte Goldnanopartikel für die Beobachtung nanopartikel-katalysierter Reaktionen in Lösung geeignet sind und auch für die Untersuchung der Eigenschaften anderer Katalysatoren eingesetzt werden könnten.



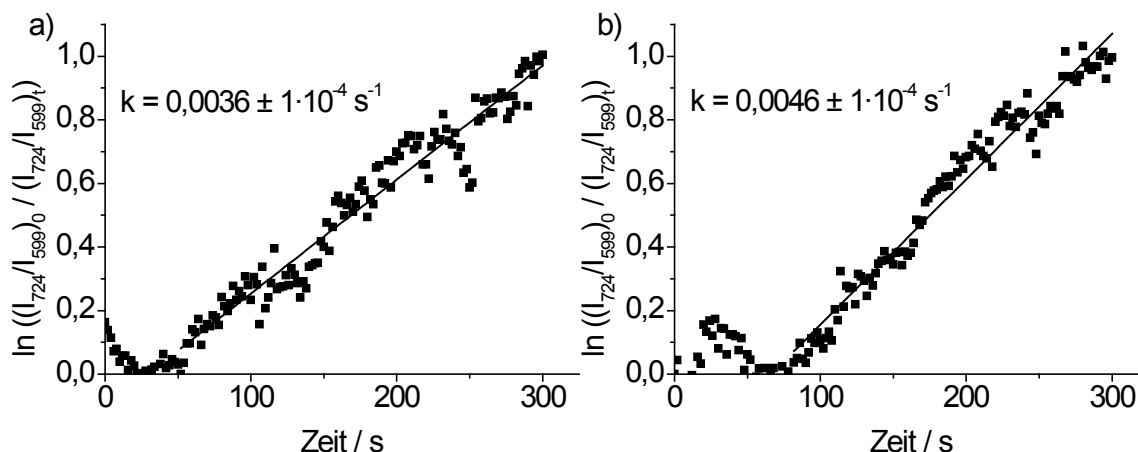


Abbildung 7-10: Pseudo-erster Ordnung-Auftragung des Intensitätsverhältnisses von PNTP und 2-NT bei  $724\text{ cm}^{-1}$  und  $599\text{ cm}^{-1}$  in Abhängigkeit der Zeit für Goldsubstrate (Citrat, Linker: APTES) mit a)  $\text{Ni}(\text{acac})_2$  und b)  $\text{Cu}(\text{acac})_2$  als Katalysator.

In Abbildung 7-10 sind Ergebnisse für die Reduktion von PNTP zu PATP unter Verwendung zwei verschiedener Acetylacetonate: (Kupfer(II)-acetylacetonat ( $\text{Cu}(\text{acac})_2$ ) und Nickel(II)-acetylacetonat ( $\text{Ni}(\text{acac})_2$ )) dargestellt. Die Reaktionskonstanten für die Reduktion von PNTP bei Verwendung dieser Katalysatoren sind kleiner als die, die mit n Platinnanopartikeln erhalten wurden (Vergleich Abbildung 7-10 und Abbildung 7-9).

Die etwas langsamere Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart des Nickelkomplexes ( $k = 0,0036 \pm 1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , Abbildung 7-10 a) im Vergleich zum Kupferkomplex ( $k = 0,0046 \pm 1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , Abbildung 7-10 b) ist in guter Übereinstimmung mit früheren Arbeiten<sup>[227]</sup>. In beiden Fällen ist der Start der Reaktion verzögert. Ein Grund für den verzögerten Start könnte die langsamere Bildung des katalytisch aktiven Metallhydridkomplexes im Falle der Metallacetylacetonate im Vergleich zu den Platinnanopartikeln sein<sup>[227]</sup>. Eine andere Möglichkeit ist, dass in Gegenwart des Natriumborhydrid Metallnanopartikel aus den Metallacetonatkomplexen gebildet werden<sup>[228]</sup>, die dann die Reaktion katalysieren.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit UV/Vis-Spektroskopie ist das PNTP in den SERS-Untersuchungen auf den Substraten gebunden. Deshalb wurden zum Vergleich die Reaktionskonstanten ebenfalls mit UV/Vis-Spektroskopie anhand der Abnahme der Extinktion der Bande von PNTP bei  $408\text{ nm}$  bestimmt. Abbildung 7-11 zeigt die Extinktionsspektren von PNTP bei unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Zugabe von Natriumborhydrid.

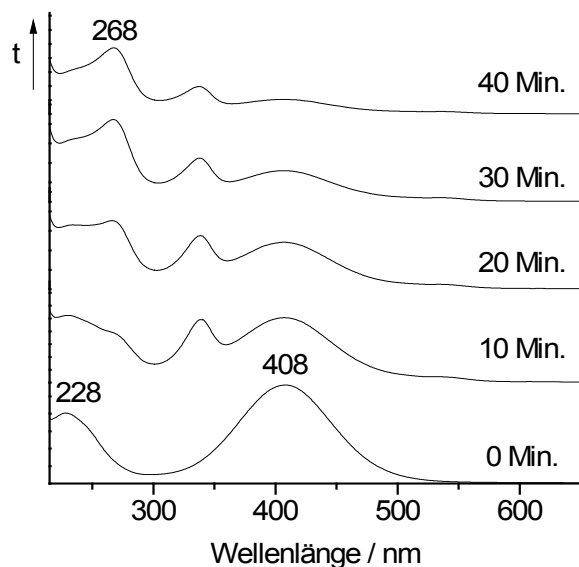


Abbildung 7-11: Zeitlicher Verlauf der Extinktionsspektren nach Zugabe von Natriumborhydridlösung und Platinnanopartikeln zu einer PNTP-Lösung.

Die Bande bei 268 nm entspricht der Bande von PATP und kann als zusätzlicher Indikator für die Reduktion verwendet werden (Abbildung 7-11). bei 410 nm in Abhängigkeit der Zeit für a) Pt-NP und b) Cu(acac)<sub>2</sub> als Katalysator.

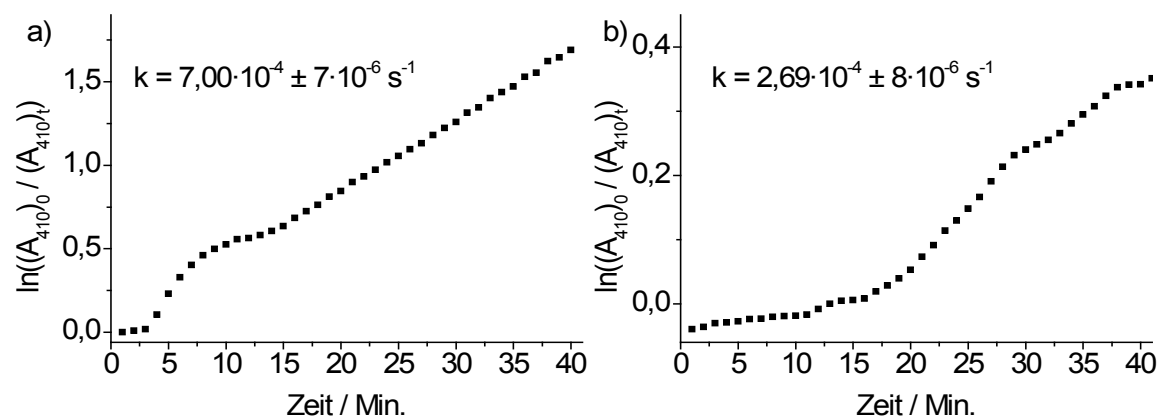


Abbildung 7-12: Pseudo-erster Ordnung-Auftragung der Extinktion der Bande von PNTP.

Der Verlauf der Extinktion mit der Zeit in Abbildung 7-12 a ist bei Verwendung von Pt-NP erst nach ca. 15 Minuten linear. Diese erste Phase wird als Induktionszeit bezeichnet. Sie wird dadurch erklärt, dass die Umstrukturierung der Oberfläche der Platinnanopartikel, die für die Katalyse notwendig ist, in Gegenwart von PNTP langsamer verläuft<sup>[229]</sup>. Da das PNTP im SERS-Experiment an die Goldnanopartikel gebunden ist, kann die Umstrukturierung der Oberfläche der Platinnanopartikel ungestört stattfinden und die Induktionszeit entfällt (Vergleich Abbildung 7-9).

Der Verlauf der Abnahme der Signalintensität mit der Zeit bei Verwendung von  $\text{Cu}(\text{acac})_2$  als Katalysator in Abbildung 7-12 b ist analog zu den Ergebnisse aus dem SERS-Experiment (Abbildung 7-10 b). Zunächst muss der aktive Komplex gebildet werden. Anschließend verläuft die Abnahme nahezu linear, d.h. sie folgt einer Kinetik pseudoerster Ordnung. Das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion mit Pt-NP und  $\text{Cu}(\text{acac})_2$  als Katalysatoren, die mit SERS und UV/Vis bestimmt wurden, stimmen gut überein (Tabelle 7-1). Das bestätigt, dass der Vergleich verschiedener Katalysatoren mittels SERS möglich ist. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionsbedingungen im UV/Vis- und SERS-Experiment können die absoluten Geschwindigkeitskonstanten jedoch nicht verglichen werden. Für die Reaktion mit  $\text{Ni}(\text{acac})_2$  konnten keine Geschwindigkeitskonstanten mittels UV/Vis-Spektroskopie ermittelt werden, weil die Absorptionsbande des aktiven Komplexes die Bande des PNTPs überlagert (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 7-1: Geschwindigkeitskonstanten für drei verschiedene Katalysatoren, ermittelt mit SERS und UV/Vis, und die Bestimmtheitsmaße der jeweiligen Fitfunktionen.

Katalysator	SERS		UV/Vis	
	$k / \text{s}^{-1}$	kor. $R^2$	$k / \text{s}^{-1}$	kor. $R^2$
Pt-NP in Lösung	$0,013 \pm 8 \cdot 10^{-4}$	0,87	$7,00 \cdot 10^{-4} \pm 7 \cdot 10^{-6}$	0,99
Immobilisierte Pt-NP	$0,011 \pm 4 \cdot 10^{-4}$	0,95	-	-
$\text{Cu}(\text{acac})_2$	$0,0046 \pm 1 \cdot 10^{-4}$	0,96	$2,69 \cdot 10^{-4} \pm 8 \cdot 10^{-6}$	0,98
$\text{Ni}(\text{acac})_2$	$0,0036 \pm 1 \cdot 10^{-4}$	0,95	-	-

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass es mit Aminosilan-immobilisierten Goldnanopartikeln möglich ist, katalytische Reaktionen mittels SERS zu verfolgen. Der Einsatz von 2-NT als interner Standard ermöglichte eine relative Quantifizierung des PNTP und die Bestimmung von Reaktionskonstanten. Diese konnten für verschiedene Katalysatoren bestimmt werden. Der Ansatz ist zudem unabhängig von den optischen Eigenschaften der Katalysatoren und ermöglicht die strukturelle Charakterisierung von Intermediaten und die Bestimmung von Reaktionskonstanten in einem Experiment.

Durch Kombination katalytisch-aktiver Platinnanopartikel mit plasmonisch-aktiven Goldnanopartikeln können nanostrukturierte Oberflächen gebildet werden, die sowohl plasmonische als auch katalytische Eigenschaften aufweisen.

Die Herstellung ist einfach und es können ähnliche Verstärkungsfaktoren wie mit immobilisierten Goldnanopartikeln erreicht werden. Dies unterscheidet sie von bisher verwendeten Kompositstrukturen. Aufgrund der hohen Signalstabilität und der hohen mikroskopischen Homogenität der Verstärkung eröffnen solche gemischten Oberflächen neue Möglichkeiten für die Untersuchung katalytischer Reaktionen mittels SERS. Die Ergebnisse haben damit sowohl für grundlegende Katalysatorforschung als auch für analytische Anwendungen Bedeutung.

## 8. Analytische Anwendungen der SERS-Substrate

### 8.1 Klassifizierung von Pollen anhand von SERS-Spektren ihrer wasserlöslichen Bestandteile

Die Analytik von Bioaerosolen, z.B. Pollen, hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen<sup>[230,231,232,233]</sup>. Das vermehrte Auftreten von Allergien hat zu einem Bedarf an schnellen und automatisierten Pollenflugwarnungen geführt. Für eine aktuelle und zeitnahe Pollenflugwarnung ist eine schnelle Klassifizierung und Identifizierung von Pollen aus der Luft notwendig. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Klassifizierung anhand von Raman-<sup>[233,234]</sup> und IR-Spektren<sup>[235,236]</sup> einzelner Pollenkörner und multivariaten Auswertemethoden, wie z.B. Clusteranalyse, möglich ist. Aufgrund der höheren Empfindlichkeit, die im SERS-Experimente erreicht werden kann, sind im Vergleich zum Raman-Experiment kürzere Messzeiten möglich<sup>[237,238]</sup>. Durch die Wechselwirkung der Analytmoleküle mit der Metalloberfläche entstehen neue elektronische Zustände im Molekül, wodurch Autofluoreszenz, die im Raman-Experiment ein Problem sein kann, effektiv gelöscht wird, wie an SERS-Messungen von Pollenhüllen demonstriert werden konnte<sup>[239]</sup>. In SERS-Experimenten der wasserlöslichen Bestandteile von Pollen treten z.T. erhebliche Schwankungen der Signalanzahl und –intensität in den Spektren auf<sup>[237,240]</sup>. Voraussetzung für eine anschließende automatisierte Zuordnung der SERS-Spektren ist jedoch, dass stabile und reproduzierbare Signale erhalten werden.

Für die Untersuchung der Eignung von SERS als schnelle Klassifizierungsmethode von Pollen wurden die wasserlöslichen Bestandteile von Pollen vier verschiedener Pflanzenarten (*Artemisia tridentata* (Wüstensalbei), *Secale cereale* (Roggen), *Populus nigra* ‘italica’ (Schwarzpappel) und *Betula fontinalis occidentalis* (Wasserbirke)) untersucht. Da es sich bei Pollen um biologische Proben handelt, musste geprüft werden, wie groß der Einfluss der biologischen Varianz zwischen den Pollenkörnern einer Pflanzenart auf die Klassifizierung ist. Es wurden für jede Pflanzenart vier identische Proben durch Überschichten der gleichen Menge Pollenkörner mit Wasser hergestellt. Von den Proben wurden SERS-Spektren, sowohl mit Goldnanopartikeln in Lösung, als auch mit immobilisierten Goldnanopartikeln aufgenommen.

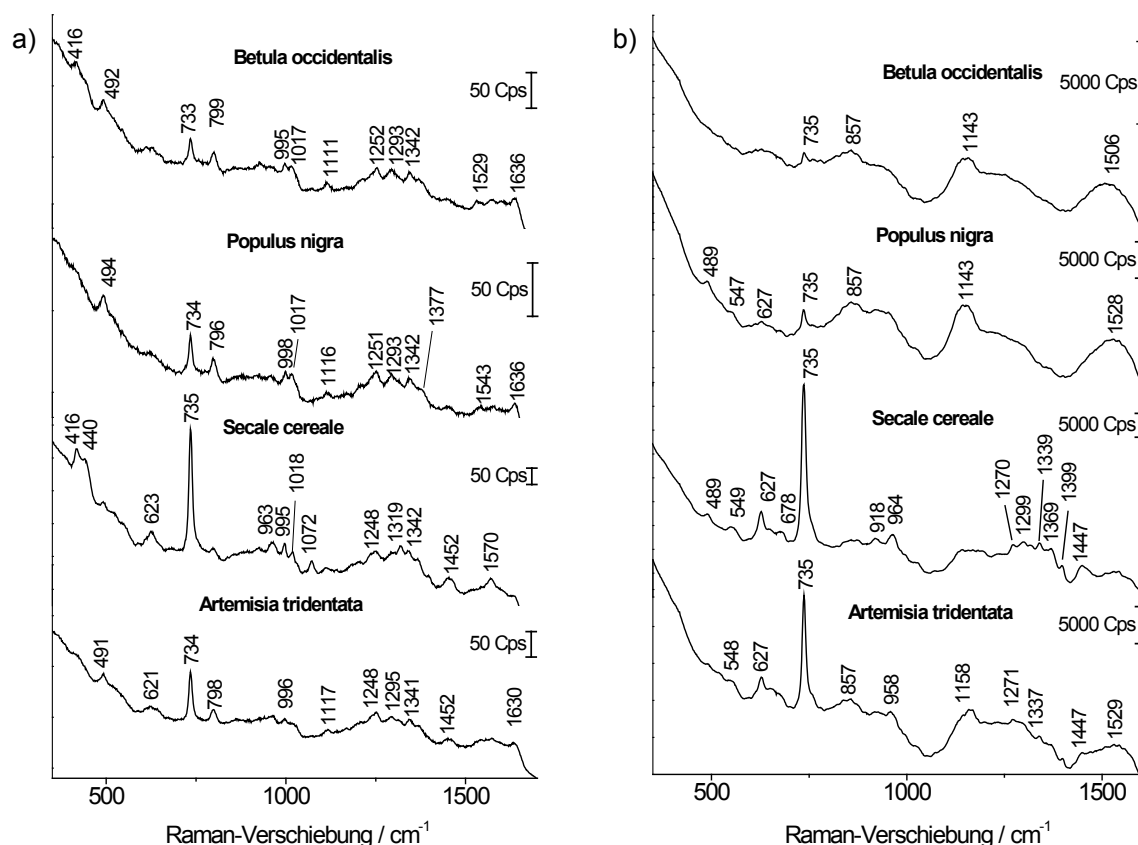


Abbildung 8-1: SERS-Spektren der wasserlöslichen Bestandteile von Pollenkörnern vier verschiedener Pflanzenarten, die a) mit Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln in Lösung und b) mit immobilisierten, Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln (Linker: APTES), erhalten wurden. Bei den Spektren handelt es sich um Mittelwertspektren von jeweils 100 Spektren einer Probe.

Die SERS-Spektren, die durch Mittelung von 100 Spektren einer Probe jeder Pflanzenart erhalten wurden, sind in Abbildung 8-1 dargestellt. Die Signale stammen sowohl von Substanzen, die sich an der Außenhülle der Pollen befinden, wie z.B. Nektarbestandteile oder Alkaloide, die dem Schutz vor Pilzbefall dienen, als auch von Substanzen aus dem Inneren der Pollen, wie z.B. Nukleobasen und Aminosäuren<sup>[237]</sup>. Diese spektralen Merkmale lassen sich sowohl mit Nanopartikeln in Lösung (Abbildung 8-1 a), als auch mit immobilisierten Goldnanopartikeln (Abbildung 8-1 b) beobachten. Zum Teil ist eine gute Übereinstimmung der relativen Bandenverhältnisse auf beiden Substraten sichtbar. Die Spektren, die mit immobilisierten Goldnanopartikeln aufgenommen wurden, weisen eine deutlich höhere Signalintensität auf. Wie in Abschnitt 5.1 gezeigt, ist die Nanopartikel-dichte auf den Oberflächen mit immobilisierten Partikeln hoch und die Anordnung begünstigt das Auftreten hoher lokaler Felder.

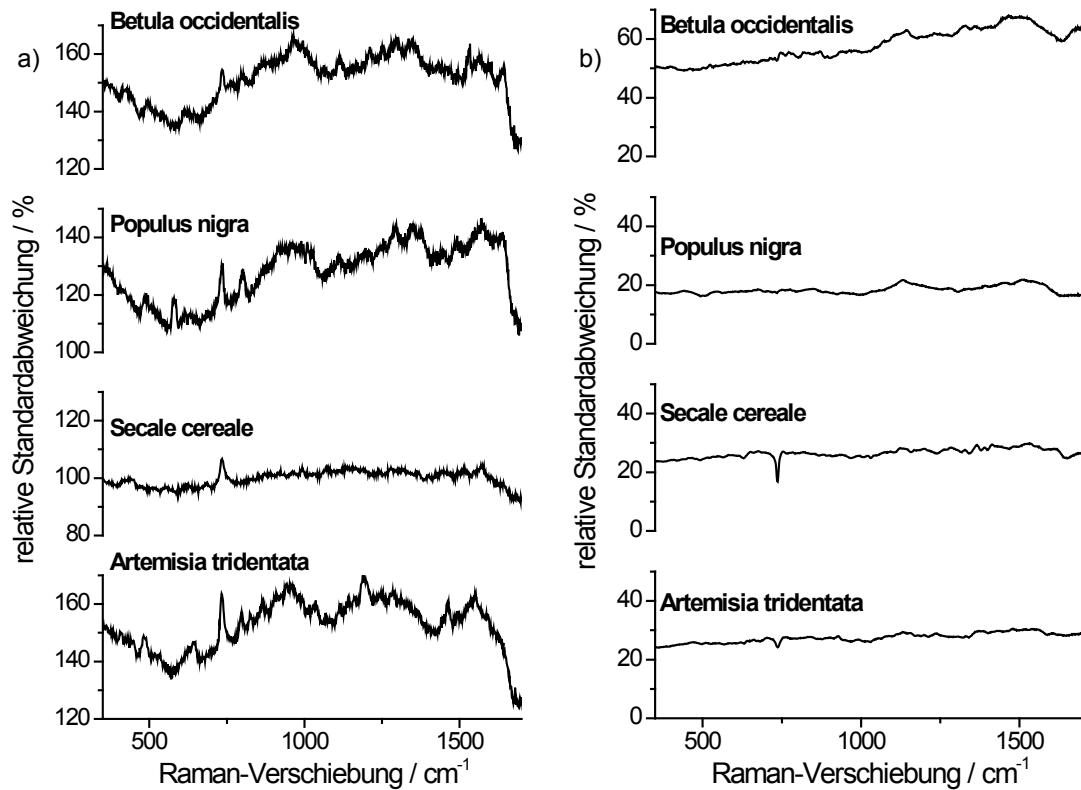


Abbildung 8-2: Relative Standardabweichung, ermittelt aus jeweils 100 SERS-Spektren einer Probe der wasserlöslichen Bestandteile von Pollen vier verschiedener Pflanzenarten für Messungen mit a) Goldnanopartikeln in Lösung und b) immobilisierten Goldnanopartikeln.

In Abbildung 8-2 sind die relativen Standardabweichungen, die aus der Mittelung von 100 Spektren jeder Pflanzenart erhalten wurden, dargestellt. Die Standardabweichungen der Spektren, die in den Experimenten mit Nanopartikeln in Lösung aufgenommen wurden (Abbildung 8-2 a) sind um ein Vielfaches größer, als die der Spektren, die mit immobilisierten Nanopartikeln aufgenommen wurden (Abbildung 8-2 b). Die Abweichungen der Spektren, die mit immobilisierten Nanopartikeln aufgenommen wurden, sind hauptsächlich durch Schwankungen des Untergrunds und durch Intensitätsschwankungen bedingt, während sich die Spektren, die mit Nanopartikeln in Lösung erhalten wurden, auch in Anzahl und Lage der Banden unterscheiden. Dies weist erneut auf die hohe mikroskopische Homogenität hin, die durch die Immobilisierung der Nanopartikel erzielt wird. Bei der Verwendung von Nanopartikeln in Lösung wurde durch Zugabe von Natriumchlorid eine Aggregation der Nanopartikel induziert. In Nanopartikelaggregaten zeigen sich, wie in den Kapiteln 1, 4 und 5 diskutiert, Gebiete besonders hoher lokaler Felder<sup>[10,34,35]</sup>, die jedoch sehr klein sind<sup>[71,241]</sup>, wie FDTD-Rechnungen einzelner Nanoaggregate zeigen (Abbildung 6-6 in Abschnitt 6).

Dadurch befinden sich nur wenige Moleküle im Bereich dieser hohen Felder. Aufgrund der hohen Verstärkung, die diese Moleküle erfahren, werden die Spektren durch Banden dieser Moleküle dominiert. Durch Brownsche Molekularbewegung diffundieren die Nanoaggregate durch das Fokusvolumen. Bei Messung komplexer Analytgemische, wie sie in Pollen auftreten, kann das zu zeitlichen Fluktuationen in den Spektren führen.

Bei der Betrachtung der Signalstabilitäten müssen die unterschiedlichen Nanopartikeldichten und Analytkonzentrationen in den jeweiligen Experimenten berücksichtigt werden. Je nach Bedeckungsgrad der Partikeloberfläche können die Moleküle unterschiedliche Orientierungen aufweisen, wodurch je nach Orientierung Änderungen der Intensitätsverhältnisse im Spektrum auftreten können<sup>[70,242]</sup>. Das Verhältnis der Anzahl Moleküle eines beliebigen Analytmoleküls zur Metalloberfläche ist für die Nanopartikel in Lösung größer, als für die immobilisierten Nanopartikel. Aufgrund des niedrigen Bedeckungsgrades würde man daher für die immobilisierten Nanopartikel größere Signalfuktuationen erwarten. Dies wird jedoch vermutlich durch die höhere mikroskopische Homogenität der immobilisierten Nanopartikel ausgeglichen. Eine erhöhte Reproduzierbarkeit der SERS-Signale wurde auch bei Messungen von Proteinen mit immobilisierten Siliziumdioxid-Silber Core-Shell-Nanopartikeln beobachtet<sup>[243]</sup>.

Bei den bisher diskutierten Spektren handelt es sich um Mittelwertspektren von Extrakten vieler Pollenkörner. Im Sinne einer effizienten und schnellen Online-Klassifizierung, die erstrebenswert wäre, müsste eine schnelle Klassifizierung einzelner Spektren gelingen. Neben noch unausgereiften Methoden zur Identifizierung<sup>[236]</sup> hat sich die hierarchische Clusteranalyse (HCA) zur Klassifizierung in der Biospektroskopie, speziell für Pollen<sup>[233,234,235]</sup>, aber auch zur Unterscheidung der Spektren unterschiedlicher Bakterienstämme<sup>[244]</sup>, etabliert. Kürzlich konnte von Matschulat et al. gezeigt werden, dass Clusteranalyse auch zur Klassifizierung von SERS-Spektren eingesetzt werden kann<sup>[2]</sup>.

Bei der HCA wird die Ähnlichkeit der Objekte über ihren Abstand im n-dimensionalen Raum bestimmt, wobei n die Anzahl der Variablen, bei Spektren die Anzahl der Pixel, ist. Für die Berechnung des Abstandes gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten, wie z.B. den euklidischen Abstand, die Mahalanobis-Distanz oder die City-Block-Metrik. Bei der Anwendung der Clusteranalyse auf Spektren wird häufig der euklidische Abstand verwendet:



$$d(x, y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n |x_i - y_i|^2} \quad (34)$$

Für die anschließende Gruppierung wird zunächst das Paar mit dem kleinsten Abstand gesucht und zu einem neuen Objekt zusammengefasst. Die weitere Gruppierung kann dann anhand verschiedener Algorithmen erfolgen. In den einfachsten Algorithmen, zu denen auch der Single-Linkage-Algorithmus gehört, erfolgt die Gruppierung anhand des kleinsten, mittleren oder größten Abstands der Objekte in den Clustern. Andere Algorithmen verwenden den Abstand zwischen den jeweiligen Schwerpunkten der Cluster. Zu dieser Gruppe gehört auch der Ward-Algorithmus, bei dem so gruppiert wird, dass die Zunahme der Fehlerquadratsumme beim Hinzukommen eines neuen Clusters minimal ist<sup>[245]</sup>:

$$d^2(j, k) = \frac{n_j n_k}{(n_j + n_k)} \left\| \bar{x}_j - \bar{x}_k \right\|^2 \quad (35)$$

wobei,  $n_j$  und  $n_k$  die Anzahlen der Objekte in zwei unterschiedlichen Clustern ( $j$  und  $k$ ) und  $\bar{x}_j$  und  $\bar{x}_k$  die jeweiligen Schwerpunkte der Cluster sind. Die Methoden für die Abstandsberechnung und die anschließende Gruppierung, mit denen die bestmögliche Trennung erreicht wird, müssen für jede Problemstellung empirisch bestimmt werden.

Mit den SERS-Spektren der Pollenproben, die mit Goldnanopartikeln in Lösung und mit immobilisierten Goldnanopartikeln erhalten wurden, wurde eine Clusteranalyse unter Verwendung des euklidischen Abstands und des Single-Linkage-Algorithmus durchgeführt. Die Dendrogramme sind in Abbildung 8-3 dargestellt.

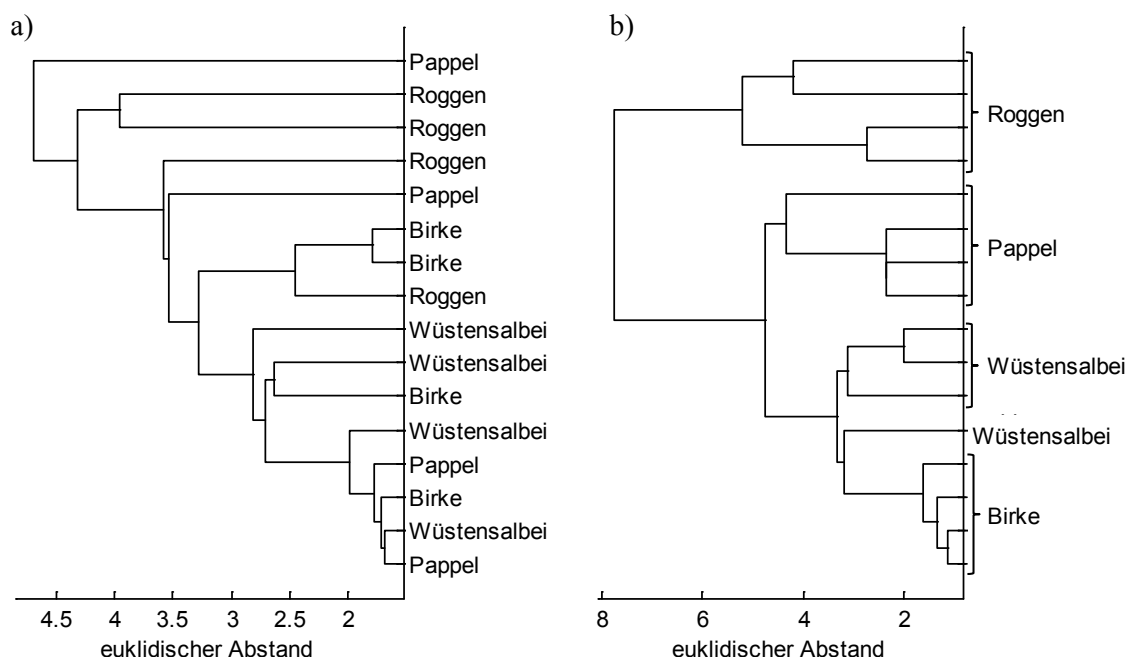


Abbildung 8-3: Ergebnisse der Clusteranalysen mit SERS-Spektren der wasserlöslichen Bestandteile von Pollenkörnern verschiedener Pflanzenarten, die mit a) Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln in Lösung und b) mit immobilisierten Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln (Linker: APTES) aufgenommen wurden, dargestellt als Dendrogramm. Die Gruppierung der Spektren erfolgte anhand ihrer euklidischen Abstände mit Hilfe des Single-Linkage-Algorithmus.

Das Klassifizierungsergebnis zeigt eine große Varianz, was einem großen euklidischen Abstand entspricht, zwischen den Spektren identisch präparierter Pollenproben einer Pflanzenart, wenn diese mit Goldnanopartikeln in Lösung aufgenommen wurden (Abbildung 8-3 a). Mit den Spektren, die mit immobilisierten Goldnanopartikeln aufgenommen wurden, ist die Varianz zwischen den Spektren identisch präparierter Pollenproben einer Pflanzenart kleiner, als die Varianz zwischen Spektren von Proben verschiedener Pflanzenarten (Abbildung 8-3 b). Es werden vier Cluster gebildet, die größtenteils die Spektren der Proben einer Pflanzenart enthalten. Eine Ausnahme bildet das Spektrum einer Wüstensalbeiprobe, das eine größere Ähnlichkeit zu den Spektren der Birkenpollenproben als zu den Spektren der anderen Wüstensalbeiprobe zeigt. Die geringere Varianz zwischen den Spektren identischer Proben bei der Verwendung von immobilisierten Goldnanopartikeln bestätigt die Beobachtung, die beim Vergleich der Standardabweichung (Abbildung 8-2) gemacht wurde und zeigt, dass die große Varianz bei Verwendung von Goldnanopartikeln in Lösung nicht auf biologische Varianz zurückgeführt werden kann.

Zur Untersuchung, welche Signale für das Klassifizierungsergebnis verantwortlich sind, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. Bei der PCA werden aus den ursprünglichen Variablen durch Linearkombination wenige neue, sogenannte latente Variablen (Hauptkomponenten), erzeugt, die den Datensatz beschreiben. Die erste Hauptkomponente zeigt in die Richtung der maximalen Varianz in den Ausgangsdaten. Die weiteren Hauptkomponenten stehen orthogonal zur ersten Hauptkomponente und zeigen erneut in die Richtung der maximalen Varianz. Die Hauptkomponenten bilden ein neues Koordinatensystem im sogenannten Faktorenraum. Die Projektionen der Datenpunkte auf die neuen Koordinatenachsen nennt man Faktorenwerte oder Scores. Der Zusammenhang zwischen den Variablen und Faktoren wird durch die Faktorenladungen bzw. Loadings beschrieben. Sie geben an, wie stark eine Variable zur entsprechenden Hauptkomponente beiträgt.

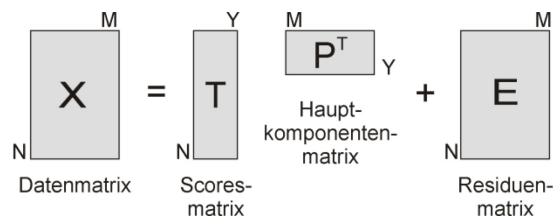


Abbildung 8-4: Mathematische Darstellung der Hauptkomponentenanalyse. Die Datenmatrix X, die die Spektren enthält, wird in eine Scoresmatrix und eine Hauptkomponentenmatrix zerlegt. Die Residuenmatrix enthält die Varianz, die nicht durch die Hauptkomponenten beschrieben wird. N = Anzahl an Proben, M = Anzahl an Variablen (Pixel im Spektrum), Y = Anzahl Faktoren.

Mathematisch gesehen ist die Hauptkomponentenanalyse die Lösung eines Eigenwertproblems. Dabei wird die Datenmatrix X, die sich aus N Spektren mit jeweils M Punkten im Spektrum zusammensetzt, in eine Scoresmatrix T, die die Faktorenwerte enthält, und eine Hauptkomponentenmatrix P, die die Faktorenladungen der Hauptkomponenten enthält, zerlegt (Abbildung 8-4). Um einen Datensatz vollständig zu beschreiben sind M Hauptkomponenten nötig, wobei M die Anzahl der ursprünglichen Variablen ist. Meist reicht jedoch eine sehr viel kleinere Anzahl von Hauptkomponenten aus, um die Varianz im Datensatz zu beschreiben. Die restlichen Hauptkomponenten enthalten dann die spektrale Varianz, die durch das Rauschen bedingt wird. Sie befinden sich in der Residuenmatrix E (Abbildung 8-4).

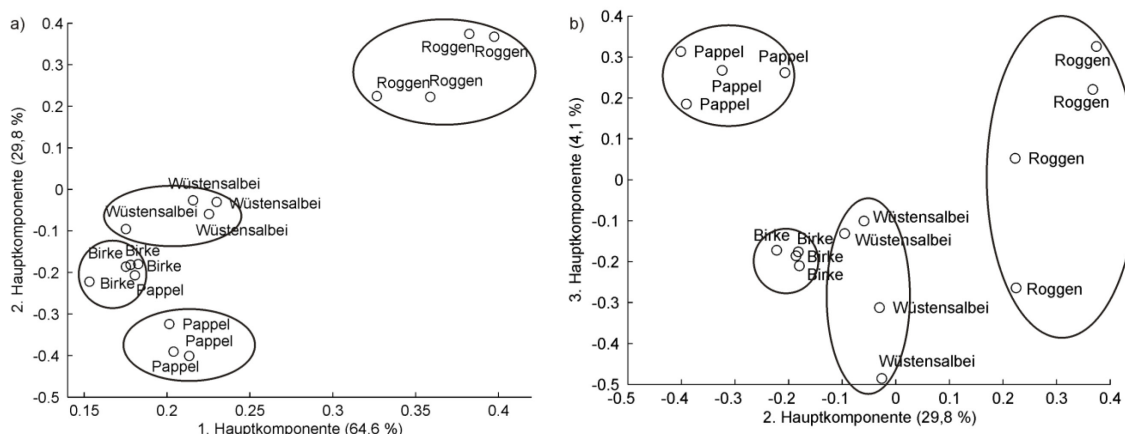


Abbildung 8-5: Auftragung der Scoreswerte, die aus der Hauptkomponentenanalyse von SERS-Spektren der wasserlöslichen Bestandteile von Pollenkörnern verschiedener Pflanzenarten erhalten wurden. a) Scoreswerte der 1. und 2. und b) der 2. und 3. Hauptkomponente.

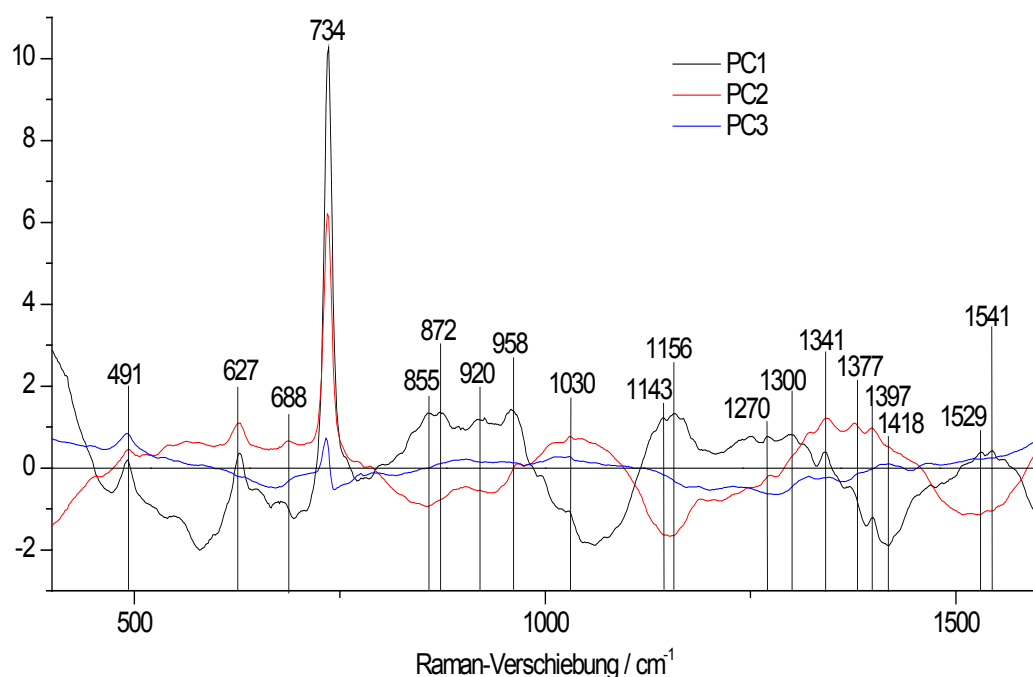


Abbildung 8-6: Loadings der Hauptkomponenten 1-3, die die aus der Hauptkomponentenanalyse von SERS-Spektren der wasserlöslichen Bestandteile von Pollenkörnern verschiedener Pflanzenarten erhalten wurden.

Mit den Spektren, die mit Nanopartikeln in Lösung erhalten wurden, konnte auch mit der Hauptkomponentenanalyse keine Gruppierung der Spektren einer Pflanzenart erfolgen (nicht gezeigt). Für die Spektren, die mit den immobilisierten Nanopartikeln gewonnen wurden, konnte eine klare Gruppierung und Trennung der einzelnen Spezies erreicht werden (Abbildung 8-5). Die ersten drei Hauptkomponenten erklären bereits 98,5 % der Varianz. Entlang der ersten Hauptkomponente, die hohe Loadingswerte bei  $734 \text{ cm}^{-1}$  und

im Bereich zwischen  $800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  sowie  $1100\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  aufweist (Abbildung 8-6), findet eine Trennung der Spektren der Roggenpollen von den Spektren der Pollen der anderen Arten statt. Die Banden bei  $734\text{ cm}^{-1}$  und im Bereich zwischen  $1100$  und  $1300\text{ cm}^{-1}$  können Schwingungen von Adenin und adeninhaltigen Substanzen, wie z.B. FAD und ATP, zugeordnet werden<sup>[149,150,246]</sup>. Im Bereich zwischen  $800$  und  $1000\text{ cm}^{-1}$  treten größtenteils Banden von Schwingungen auf, die Aminosäuren zugeordnet werden können<sup>[247]</sup>. Entlang der 2. Hauptkomponente können die Spektren der Wüstensalbeipollen von denen der Pappel- und Birkenpollen getrennt werden. Die Trennung der Spektren von Birken- und Pappelpollen findet entlang der 3. Hauptkomponente statt.

Mit der Hauptkomponentenanalyse ist es gelungen, die Spektren der vier Pollenspezies in vier separate Gruppen zu unterteilen. Dies bestätigt die Ergebnisse der Clusteranalyse. Das Beispiel der Pollen illustriert, dass aufgrund der hohen Signalstabilität, die mit den immobilisierten Nanopartikeln erreicht wird, automatisierte Auswertemethoden angewendet werden können. Die Anwendung solcher Methoden ist Voraussetzung dafür, dass das volle Multiplexing-Potenzial von SERS zur Klassifizierung und Identifizierung komplexer Proben genutzt werden kann.

## **8.2 Anwendung funktionalisierter Substrate für die Messung von Neurotransmittern**

Für pharmakologische Anwendungen ist die Detektion von Neurotransmittern von großem Interesse, da diese bei Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson und Multiple Sklerose eine wichtige Rolle spielen<sup>[248,249]</sup>. Die Verwendung von SERS bietet gegenüber den bisher verwendeten Methoden wie HPLC/MS, NMR und elektrochemischen Methoden<sup>[250]</sup> den Vorteil, dass eine schnelle Messung niedriger Konzentrationen möglich ist. Das Potenzial von SERS für die Messung von Neurotransmittern konnte bereits mit Silbernanopartikeln in Lösung<sup>[251]</sup>, auf Silberelektroden<sup>[252]</sup> und mit Nanopartikeln in Sol-Gelen und Polymeren<sup>[253]</sup> gezeigt werden.

Die physiologisch auftretenden Konzentrationen an Neurotransmittern sind sehr gering. Ein Problem, das bei SERS-Messungen mit sehr geringen Analytkonzentrationen auftreten kann, sind Signalschwankungen. Ein Beispiel hierfür ist die Messung von Hämoglobin in sehr niedrigen Konzentrationen auf einer Silberoberfläche<sup>[254]</sup>.

Im Abschnitt 8.1 konnte gezeigt werden, dass die Immobilisierung von Nanopartikeln zu einer höheren Signalstabilität, die sich insbesondere bei sehr geringen Analytkonzentrationen positiv auswirken sollte, führen kann. Um die Detektion von Neurotransmittern mit den neuen Substraten zu erproben, wurden Experimente mit Norepinephrin, einem Katecholamin aus der Gruppe der biogenen Amine durchgeführt.

Abbildung 8-7 zeigt exemplarisch 4 Spektren einer Messung von Norepinephrin auf immobilisierten Silbernanopartikeln. Die Signalintensität ist in diesen Spektren höher als in Spektren, die mit Silbernanopartikeln in Lösung aufgenommen wurden (nicht gezeigt). Die Immobilisierung der Nanopartikel führt also zu einer Steigerung der führt Signalintensität. Betrachtet man die Spektren von Norepinephrin auf immobilisierten Silbernanopartikeln, so fällt auf, dass sie sowohl Unterschiede in Signalanzahl, als auch in der relativen Signalintensität aufweisen, die eine spezifische Detektion der Neurotransmitter unmöglich machen.

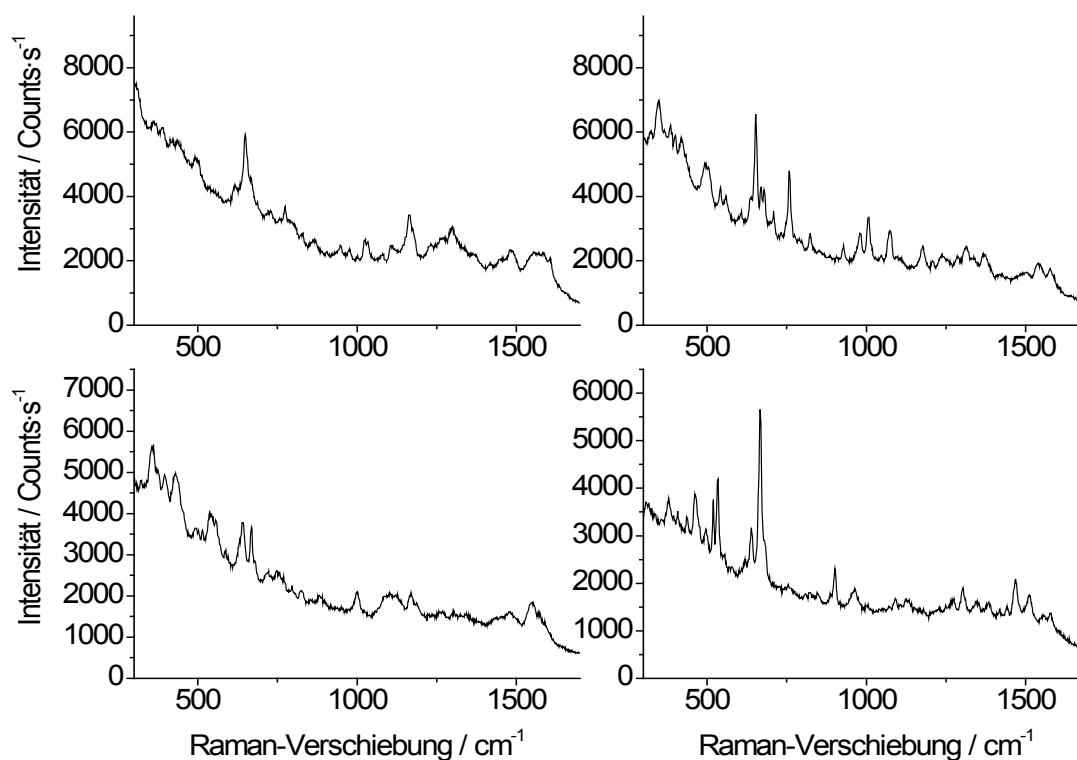


Abbildung 8-7: SERS-Spektren von 10<sup>-3</sup> M Norepinephrinlösung auf einem Hydroxylamin-reduzierten immobilisierten Silbernanopartikeln (Linker: APTES) ( $\lambda = 785 \text{ nm}$ ,  $I = 4,8 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 1 s).

Die Signalschwankungen weisen darauf hin, dass die Anbindung des Analytmoleküls an die Nanopartikeloberfläche nicht spezifisch ist und das Molekül in unterschiedlichen

Orientierungen auf der Oberfläche adsorbieren kann. Je nach Orientierung werden die verschiedenen Banden des Norepinephrins unterschiedlich verstärkt<sup>[70,255]</sup>.

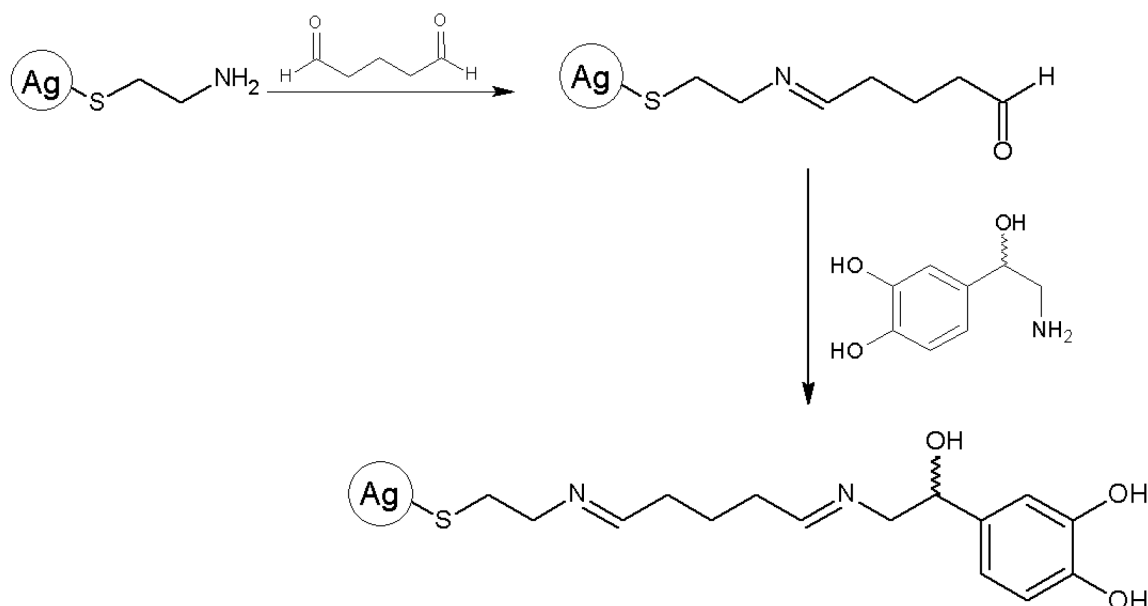


Abbildung 8-8: Schematische Darstellung der Funktionalisierung der Nanopartikel mit Cysteamin und Glutaraldehyd und Anbindung des Norepinephrins.

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass durch eine spezifische Funktionalisierung von Nanopartikeloberflächen Analytmoleküle in die Nähe der Nanopartikel gebracht und so der Detektion zugänglich gemacht werden können<sup>[60,61,62]</sup>. Durch gezielte Funktionalisierung kann auch eine spezifische Orientierung des Moleküls relativ zur Oberfläche vorgegeben werden. Um eine selektive Anbindung des Norepinephrins zu erreichen, sollte die leichte Funktionalisierbarkeit der immobilisierten Nanopartikel ausgenutzt werden. Dabei stellt sich jedoch nicht nur die Frage, inwieweit ein Molekül an die Nanopartikel angebunden werden kann, sondern auch, ob die Anbindung der Nanopartikel an die Glasoberfläche über das Aminosilan stabil genug ist, um eine Funktionalisierung zu ermöglichen. Für die Bindung des Norepinephrin wurde Glutaraldehyd gewählt, da es sehr reaktiv ist und mit Norepinephrin unter Bildung eines Imins reagieren kann (Abbildung 8-8). Das Glutaraldehyd sollte wiederum über Cysteamin an die Nanopartikel gebunden werden (Abbildung 8-8).

Wie durch SERS-Spektren in der Literatur belegt ist, bindet Cysteamin auf Metalloberflächen in zwei Konformationen (trans und gauche, Abbildung 8-9)<sup>[175]</sup>. Das Verhältnis der beiden Konformationen hängt von der Konzentration von Cysteamin und der Art des Metalls ab<sup>[175]</sup>.

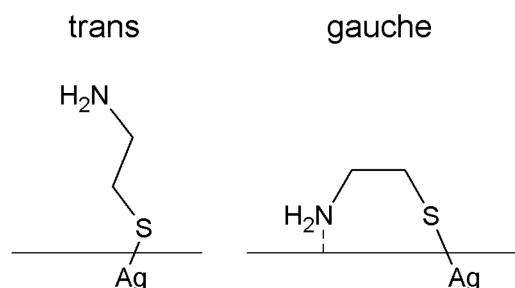


Abbildung 8-9: Mögliche Konformationen des Cysteamin, wenn es auf Metalloberflächen gebunden ist (hier als Beispiel eine Silberoberfläche).

Je höher die Cysteaminkonzentration, desto mehr Moleküle liegen in der trans-Konformation vor, weil in dieser Konformation der Platzbedarf der Moleküle geringer ist. Für die weitere Reaktion mit Glutaraldehyd müssen möglichst viele Moleküle in der trans-Konformation vorliegen, weil dort die Aminogruppe für das Glutaraldehyd zugänglich ist.

Das Verhältnis von gauche- und trans-Konformation kann anhand der Intensität der C-S-Streckschwingung der jeweiligen Konformation (gauche:  $648\text{ cm}^{-1}$ , trans:  $733\text{ cm}^{-1}$ ) in den SERS-Spektren abgeschätzt werden<sup>[175]</sup>. Abbildung 8-10 b zeigt SERS-Spektren immobilisierter Hydroxylamin-reduzierter Silbernanopartikel, die mit Cysteaminlösungen unterschiedlicher Konzentrationen funktionalisiert wurden. Bei Funktionalisierung mit 20 mM Cysteaminlösung sind die Intensitäten der beiden Banden ungefähr gleich, d.h. ungefähr die Hälfte der Cysteaminmoleküle liegen in der trans-Konformation vor (Abbildung 8-10 b). Allerdings führt die Funktionalisierung mit 20 mM Cysteaminlösung zu einer Abnahme der Intensität der Plasmonenbande, was darauf hindeutet, dass während der Funktionalisierung Nanopartikel von der Oberfläche gelöst werden (rotes Spektrum in Abbildung 8-11). Auch bei Verwendung einer niedrigeren Konzentration (5 mM) konnte eine Abnahme der Extinktion beobachtet werden (blaues Spektrum in Abbildung 8-11). Außerdem führte die Verringerung der Konzentration auch zu einer Verschiebung des Verhältnisses der unterschiedlichen Konformationen zu Gunsten der gauche-Konformation, wie die Verringerung der Intensität der Bande bei  $735\text{ cm}^{-1}$  im Vergleich zur Intensität der Bande bei  $645\text{ cm}^{-1}$  zeigt (Vergleich Abbildung 8-10 a und b). Bei weiterer Reduzierung der Konzentration auf 2 mM konnten keine Cysteaminsignale detektiert werden.



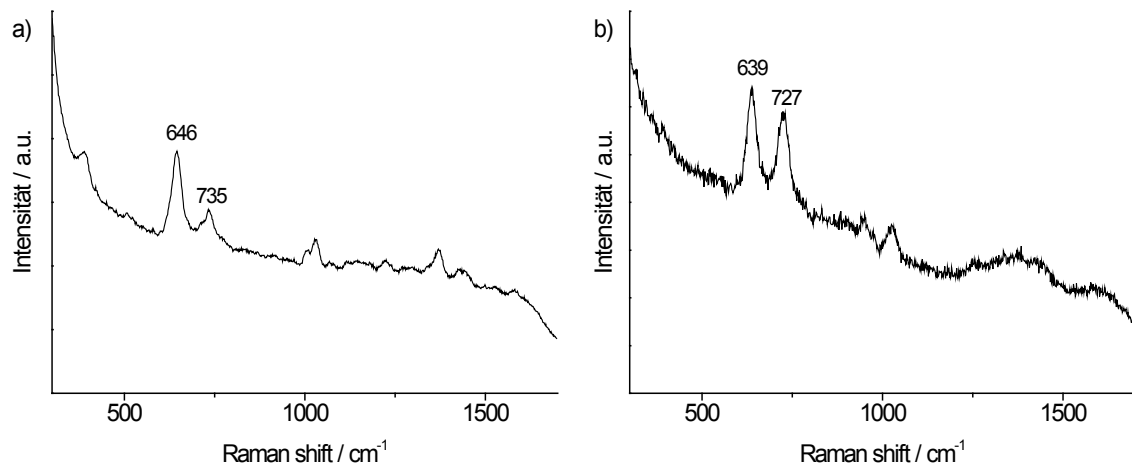


Abbildung 8-10: SERS-Spektren von Hydroxylamin-reduzierten, immobilisierten Silbernanopartikeln (Linker: APTES)Silbersubstraten, die mit a) 5 mM Cysteaminlösung und b) 20 mM Cysteaminlösung funktionalisiert wurden ( $\lambda = 785 \text{ nm}$ ,  $I = 4,8 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 10 s).

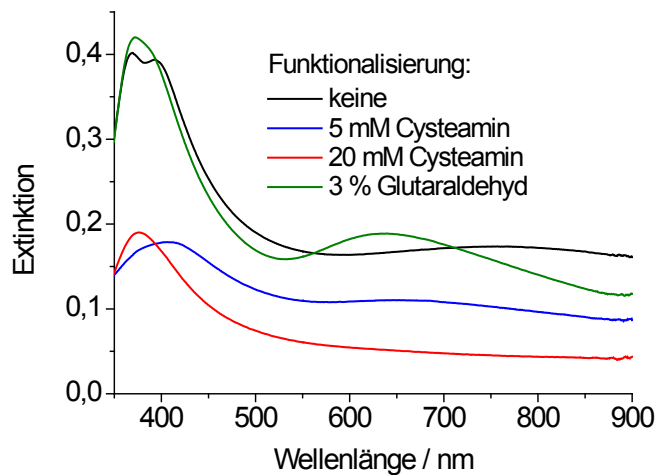


Abbildung 8-11: Extinktionsspektren von Hydroxylamin-reduzierten, immobilisierten Silbernanopartikeln (Linker: APTES) vor und nach der Funktionalisierung mit Cysteamin und Glutaraldehyd.

Es wurde deshalb untersucht, ob es möglich ist, die Substrate direkt mit Glutaraldehyd zu funktionalisieren. Bei Inkubation der Substrate in 3 %-iger Glutaraldehydlösung für 4 h wurden SERS-Spektren von Glutaraldehyd erhalten (siehe Abbildung 8-12 b). Dies deutet darauf hin, dass eine direkte Funktionalisierung mit Glutaraldehyd möglich ist. Das SERS-Spektrum von Glutaraldehyd unterscheidet sich deutlich vom Raman-Spektrum und weist Banden bei  $\sim 390 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1078 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1183 \text{ cm}^{-1}$  und  $1586 \text{ cm}^{-1}$  auf (Vergleich Abbildung 8-12 a und b). Eine Erhöhung der Glutaraldehydkonzentration auf 10 % und eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 16 h lieferten die gleichen Ergebnisse. Basierend auf dieser Erkenntnis wurde die Funktionalisierung der Substrate in allen weiteren Experimenten mit 3 %-iger Glutaraldehydlösung für 4 h durchgeführt.

Bei der direkten Funktionalisierung mit Glutaraldehyd wurde keine Abnahme der Extinktion im Bereich der Plasmonenbande beobachtet (grünes Spektrum in Abbildung 8-11).

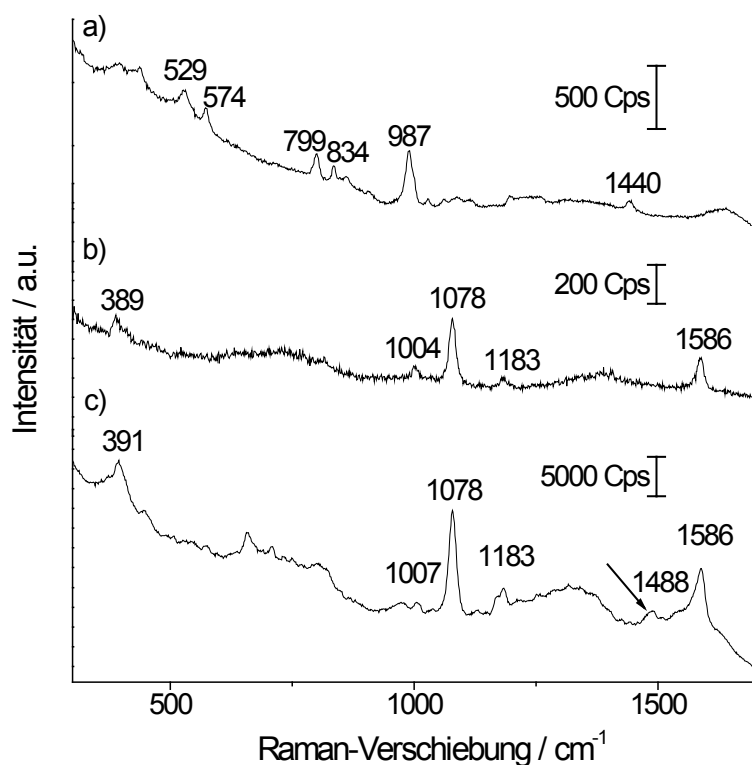


Abbildung 8-12: a) Raman-Spektrum von 3 %-igem Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 8,2) ( $\lambda = 785 \text{ nm}$ ,  $I = 4,8 \cdot 10^5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $10 \times 10 \text{ s}$ ), b, c) SERS-Spektren von auf einem Hydroxylamin-reduzierten immobilisierten Silbernanopartikeln (Linker: APTES), die mit 3 %-iger Glutaraldehydlösung funktionalisiert wurden, b) vor und c) nach Umsetzung mit  $10^{-5} \text{ M}$  Norepinephrin für 1 h ( $\lambda = 785 \text{ nm}$ ,  $I = 4,8 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 1 s).

Die mit 3%-igem Glutaraldehyd funktionalisierten Substrate wurden für die Messung von Norepinephrin eingesetzt. Nach der Inkubation der Substrate in einer  $10^{-5} \text{ M}$  Norepinephrinlösung für 1 h kann eine zusätzliche Bande bei  $1488 \text{ cm}^{-1}$  beobachtet werden (markiert mit einem Pfeil in Abbildung 8-12 c), die dem Norepinephrin zugeordnet werden kann<sup>[251,253,256]</sup>. Diese Bande tritt reproduzierbar in allen gemessenen Spektren auf.

Der Vergleich der SERS-Spektren von Norepinephrin auf Glutaraldehyd-funktionalisierten und unfunktionalisierten Substraten (Vergleich Abbildung 8-12 c und Abbildung 8-7) zeigt, dass die Funktionalisierung mit Glutaraldehyd zu einer selektiven Anbindung von Norepinephrin führt. Mit den funktionalisierten Substraten war es möglich, Norepine-

phrin bis zu einer Konzentration von  $10^{-6}$  M reproduzierbar zu detektieren. Leider weisen die Spektren bei diesen noch unphysiologischen Bedingungen von  $10^{-6}$  M Norepinephrin ein intensives SERS-Spektrum auf, das von Glutaraldehyd herrührt.

Auch wenn in diesem konkreten Beispiel die Funktionalisierung, aufgrund des intensiven SERS-Spektrums von Glutaraldehyd, die Detektion des Analytmoleküls beeinflusst, so zeigt es doch, dass eine Funktionalisierung zur Erhöhung der Signalstabilität und zur spezifischen Detektion von Analytmolekülen beitragen kann. Die Anbindung der Nanopartikel an die Glasoberfläche durch das Aminosilan ist stabil und wird durch die Funktionalisierung nicht beeinflusst.

### **8.3 Relative Quantifizierung von 6-Methylmercaptapurin für die Bestimmung der Thiopurin-S-Methyltransferaseaktivität**

Für den Einsatz von SERS in der Routineanalytik, wie sie z.B. in biomedizinischen Laboren durchgeführt wird, werden Substrate benötigt, die bei Bedarf einfach und reproduzierbar direkt im analytischen Labor hergestellt werden können. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, weisen organosilan-immobilisierte Nanopartikel neben einer einfachen Herstellung auch eine hohe Stabilität und Reproduzierbarkeit auf, wodurch sie sich prinzipiell für den Einsatz in der Routineanalytik eignen. Um die einfache Herstellung vollständig ausnutzen zu können, wäre es von Vorteil, wenn keine weitere Funktionalisierung der Oberflächen, wie sie in Abschnitt 8.2 gezeigt wurde, nötig wäre. Aus bisherigen Arbeiten ist bekannt, dass Thioverbindungen spezifisch an Gold- und Silberoberflächen binden und stabile Monolagen bilden<sup>[38,61,173,174,257]</sup>. Bei diesen Verbindungen ist eine Funktionalisierung der Oberflächen nicht nötig.

Eine medizinisch relevante Thioverbindung ist das 6-Mercaptopurin (6-MP). Es wird in Form von Azathioprin bei Organtransplantationen zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen, sowie für die Behandlung entzündlicher Darmerkrankungen eingesetzt. Für den Abbau des 6-MP im menschlichen Körper ist u.a. das Enzym Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT) verantwortlich, welches das 6-MP mit S-Adenosyl-L-methionin als Substrat methyliert (Abbildung 8-13). Liegt, wie bei ca. 10 % der Bevölkerung, eine verminderte Aktivität des Enzyms TPMT vor, so kommt es zu einer Anreicherung von Thioguaninnukleotiden im Körper. Dies kann zu einer Myelosuppression (Knochenmarkshemmung) und in Folge dessen zu einer Anämie (Blutarmut) führen<sup>[258]</sup>. Deshalb muss vor jeder Behandlung mit Azathioprin die TPMT-Aktivität bestimmt werden.

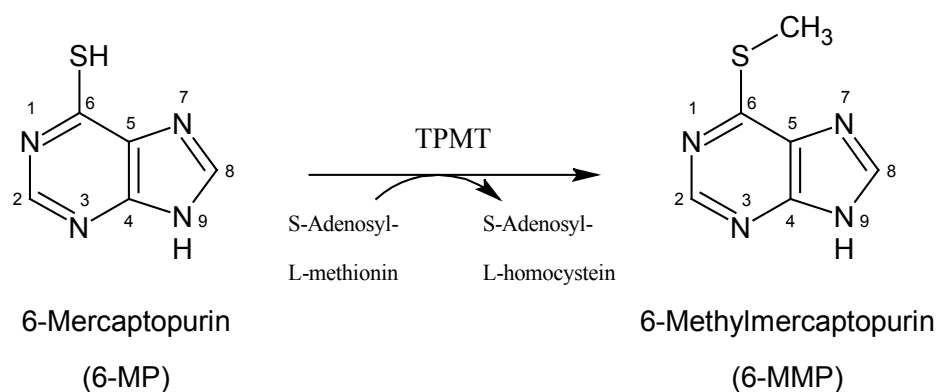


Abbildung 8-13: Schematische Darstellung des Abbau von 6-MP durch Methylierung mit Hilfe des Enzyms Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT).

Bisher geschieht dies über HPLC/MS-Messungen der methylierten Produkte von 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin<sup>[259,260]</sup> oder über die Detektion von Mutationen im TPMT-Gen<sup>[261]</sup>. Diese Methoden sind sehr zeitaufwändig und kostenintensiv. Eine schnelle und einfache Bestimmung der TPMT-Aktivität kann über die Detektion von 6-Methylmercaptopurin (6-MMP) mittels SERS in einer Blutprobe erfolgen, beispielsweise in einem Lab-on-a-Chip-Ansatz<sup>[262]</sup>. Dabei wurden Blutproben mit 6-MP versetzt und nach einiger Zeit in einer Durchflusszelle mit einer Silbernanopartikellösung gemischt.

In Abbildung 8-14 sind SERS-Spektren von 6-MP und 6-MMP auf immobilisierten Gold- und Silbernanopartikeln dargestellt. Die Spektren von 6-MP und 6-MMP unterscheiden sich hauptsächlich durch das Intensitätsverhältnis der Banden. In den Spektren von 6-MP und 6-MMP, die mit den immobilisierten Silbernanopartikeln aufgenommen wurden, treten die größten Intensitätsänderungen für die Banden bei  $434\text{ cm}^{-1}$ ,  $612\text{ cm}^{-1}$ ,  $691\text{ cm}^{-1}$ ,  $868\text{ cm}^{-1}$  und  $1004\text{ cm}^{-1}$  auf (Abbildung 8-14 b). Dabei handelt es sich jeweils um Banden, die C-S-H-Schwingungsanteile enthalten<sup>[128]</sup>. Die Banden bei  $1145\text{ cm}^{-1}$  und  $1204\text{ cm}^{-1}$  im Spektrum von 6-MP verschieben sich zu  $1163\text{ cm}^{-1}$  und  $1226\text{ cm}^{-1}$  im Spektrum von 6-MMP. Diese Banden können Schwingungen der N1-C2- und N1-C6-Atome zugeordnet werden. Die Verschiebung der Banden zu größeren Wellenzahlen weist auf eine Erhöhung der Elektronendichte am N1-Atom und eine stärkere Beteiligung des N1-Atoms bei der Koordinierung von 6-MMP auf den Silbernanopartikeloberflächen im Vergleich zum 6-MP hin. Dies ist in guter Übereinstimmung mit bisherigen SERS-Untersuchungen und quantenchemischen Berechnungen der Struktur von 6-MP auf Silber-

oberflächen, in denen auch eine Koordinierung des 6-MP, vorwiegend über das N1-Atom gefunden wurde<sup>[128,263]</sup>.

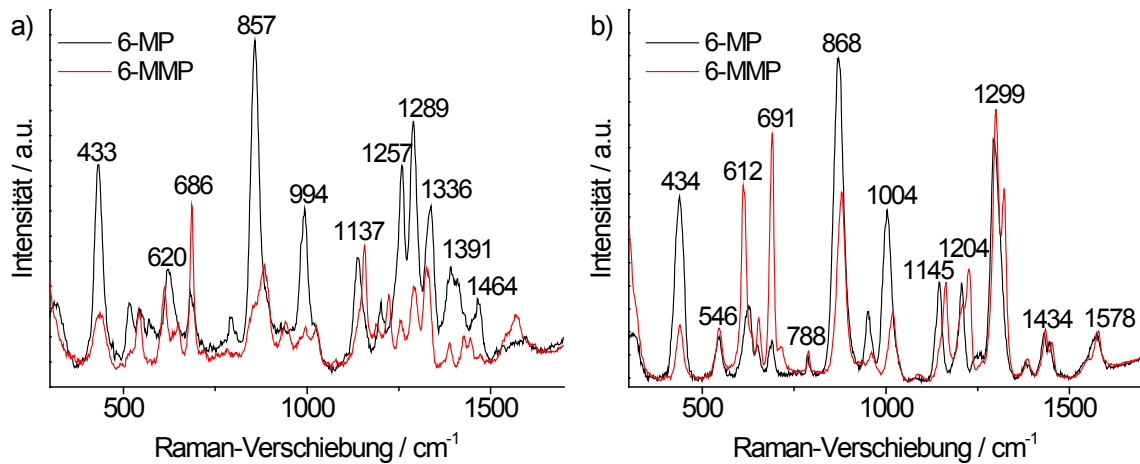


Abbildung 8-14: SERS-Spektren von 6-MP- und 6-MMP-Lösung (jeweils  $10^{-5}$  M) auf a) Citrat-reduzierten Gold- und b) Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikelsubstraten (Immobilisierung mit APTES) ( $\lambda = 785$  nm,  $I = 4,8 \cdot 10^4$  W·cm $^{-2}$ , 1 s).

Die SERS-Spektren von 6-MP und 6-MMP auf immobilisierten Goldnanopartikeln, unterscheiden sich von denen, die mit Silbernanopartikeln aufgenommen wurden, besonders im Bereich zwischen  $1250$  cm $^{-1}$  und  $1400$  cm $^{-1}$  (Vergleich Abbildung 8-14 a und b). Während in den Spektren mit Silbernanopartikeln nur eine Bande bei  $1299$  cm $^{-1}$  auftritt, weisen die Spektren mit Goldnanopartikeln Banden bei  $1257$  cm $^{-1}$ ,  $1289$  cm $^{-1}$  und  $1336$  cm $^{-1}$  auf. Die Banden bei  $1289$  cm $^{-1}$  bzw.  $1299$  cm $^{-1}$  können Schwingungen der N1-C2- und N1-C6-Atome zugeordnet werden, während die Banden bei  $1257$  cm $^{-1}$  und  $1336$  cm $^{-1}$  Streckschwingungen der C2-N3- bzw. C4-N9-Atome zugeordnet werden können<sup>[128]</sup>. Das weist darauf hin, dass die Koordination des 6-MP auf Goldoberflächen über das N1-, N9- und N3-Atom stattfindet.

Stabile Signale und eine gute Reproduzierbarkeit wurden bei einer 6-MP-Konzentration von  $10^{-5}$  M beobachtet. Beim Vergleich von Spektren von 6-MP und 6-MMP, die mit jeweils fünf identisch hergestellten Gold- und Silbernanopartikelsubstraten aufgenommen wurden, zeigte sich, dass die Reproduzierbarkeit der Spektren in den Messungen mit Silbernanopartikeln größer war, als mit Goldnanopartikeln (nicht gezeigt). Deshalb wurden für alle folgenden Experimente Silbernanopartikelsubstrate verwendet.

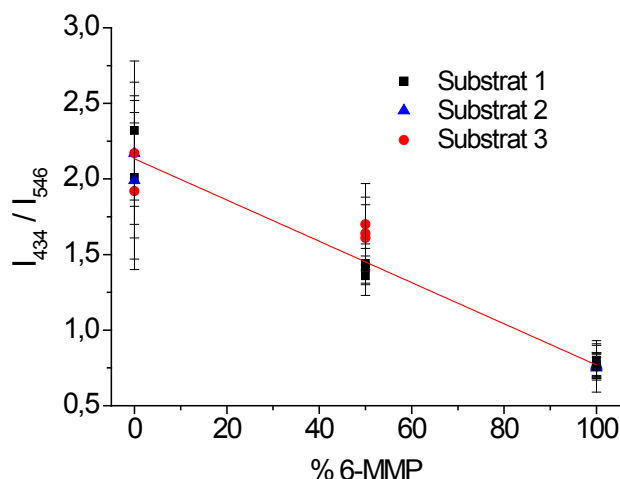


Abbildung 8-15: Intensitätsverhältnis der Banden bei  $434\text{ cm}^{-1}$  und  $546\text{ cm}^{-1}$  im SERS-Spektrum unterschiedlicher Mischungen von 6-MP und 6-MMP in Abhängigkeit des Anteils von 6-MMP ( $R^2$ : 0,97) auf drei identisch hergestellten Silbernanopartikelsubstraten (Hydroxylamin, Linker: APTES). Für jeden Messpunkt wurden 100 Spektren gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

Für einen potentiellen Einsatz in der Bestimmung der Aktivität des Enzyms TPMT muss man über den kürzlich von März et al. vorgeschlagenen qualitativen Ansatz<sup>[262]</sup> hinausgehen und das 6-MMP quantifizieren. Dies ist durch die hohe Signalstabilität und Reproduzierbarkeit auf den immobilisierten Nanopartikeln gegeben. Der Anteil an 6-MMP kann über das Bandenverhältnis der C-S-Streckschwingung bei  $434\text{ cm}^{-1}$  und der Ringschwingung bei  $546\text{ cm}^{-1}$  <sup>[128]</sup> bestimmt werden. Dieses ist für 6-MP und 6-MMP unterschiedlich und es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Bandenverhältnis und dem Anteil an 6-MMP (Abbildung 8-15). Das Bandenverhältnis wurde für drei identische Substrate bestimmt und zeigt eine hohe Reproduzierbarkeit. Damit ist belegt, dass sich 6-MMP auf immobilisierten Silbernanopartikeln über SERS verlässlich quantifizieren lässt. Prinzipiell kann nun versucht werden, die Enzymreaktion auf den Oberflächen zu beobachten.

Von einer normalen Enzymaktivität spricht man, wenn mehr als 20 mg 6-MP pro Gramm Hämoglobin und Stunde umgesetzt werden. Bei einer Umsetzung zwischen 10 und 20 mg liegt eine verminderte Aktivität und somit eine erniedrigte Metabolisierungsrate vor, während bei weniger als 10 mg keine Enzymaktivität vorliegt<sup>[264]</sup>. Anhand der Größe der Nanopartikel und der Anzahl der Nanopartikel pro Fläche, die mit Transmissionselektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie bestimmt wurden, und der, aus der Literatur bekannten Bedeckungsdichte für 6-MP auf einer Goldoberfläche<sup>[123]</sup> von  $5.7 \cdot 10^{-10}\text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ , kann die Masse an 6-MP auf den Substraten abgeschätzt werden.

Demnach befinden sich ca. 0,1 mg 6-MP auf der Silberoberfläche. In 2 ml einer lysierten Blutprobe befinden sich ca. 0,8 g Hämoglobin. Die Umwandlung sollte also bei normaler Enzymaktivität sehr schnell (ca. 25 s) ablaufen.

Um in einem ersten Schritt zu testen, ob die Enzymreaktion auf den Substraten detektiert werden kann, wurde kommerziell erhältliche Thiopurin-S-methyltransferase verwendet und die Reaktion erst nach 24 h durch Waschen der Substrate beendet. Die anschließenden SERS-Messungen ergaben jedoch keine 6-MMP-Spektren. Dies deutet darauf hin, dass unter den Bedingungen dieses Vorversuchs keine Umwandlung von 6-MP stattgefunden hat. Um auszuschließen, dass die Hemmung der Reaktion durch die Anbindung des 6-MP an die Nanopartikeloberfläche verursacht wurde, wurde das Enzym direkt zu einer 6-Mercaptopurinlösung gegeben und die Reaktionsmischung nach 24 h auf einem unfunktionalisierten Substrat gemessen. Auch in diesem Fall erfolgte keine Umwandlung des 6-MP. Somit kann ein Einfluss der Wechselwirkung von 6-MP mit den Nanopartikeln auf den Verlauf der Enzymreaktion ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Grund könnte sein, dass das kommerziell erhältliche Enzym nicht aktiv ist. Um die Aktivität des Enzyms zu testen, wurden LC-MS-Messungen durchgeführt. Vorversuche zeigten, dass 6-MP und 6-MMP mit dieser Methode auch in niedrigen Konzentrationen ( $\sim 10^{-7}$  M) detektiert werden können. Im Totalionenstromchromatogramm einer Probe von  $10^{-5}$  M 6-MP, das für 24 h mit dem Enzym umgesetzt wurde, sind vier Signale zu erkennen (Abbildung 8-16). Die Signale bei 2,88 Minuten und 3,62 Minuten lassen sich auf Verunreinigungen zurückzuführen (Abbildung 8-16 a). Das Signal bei 5,53 Minuten kann 6-MP zugeordnet werden, wie aus dem extrahierten Ionenstromchromatogramm für ein  $m/z$  von 153,1 ersichtlich ist (Abbildung 8-16 b). Das Signal bei 12,39 Minuten entspricht einem  $m/z$  von 298 und kann 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosin, einem Fragment des S-Adenosyl-L-methionin, zugeordnet werden<sup>[265]</sup>. Im extrahierten Ionenstromchromatogramm für ein  $m/z$  von 167,1, welches dem  $m/z$  von 6-MMP entspricht, sind keine Signale vorhanden (Abbildung 8-16 c). Es wurde also kein 6-MMP aus dem 6-MP gebildet, was auf eine Inaktivität des Enzyms hinweist.

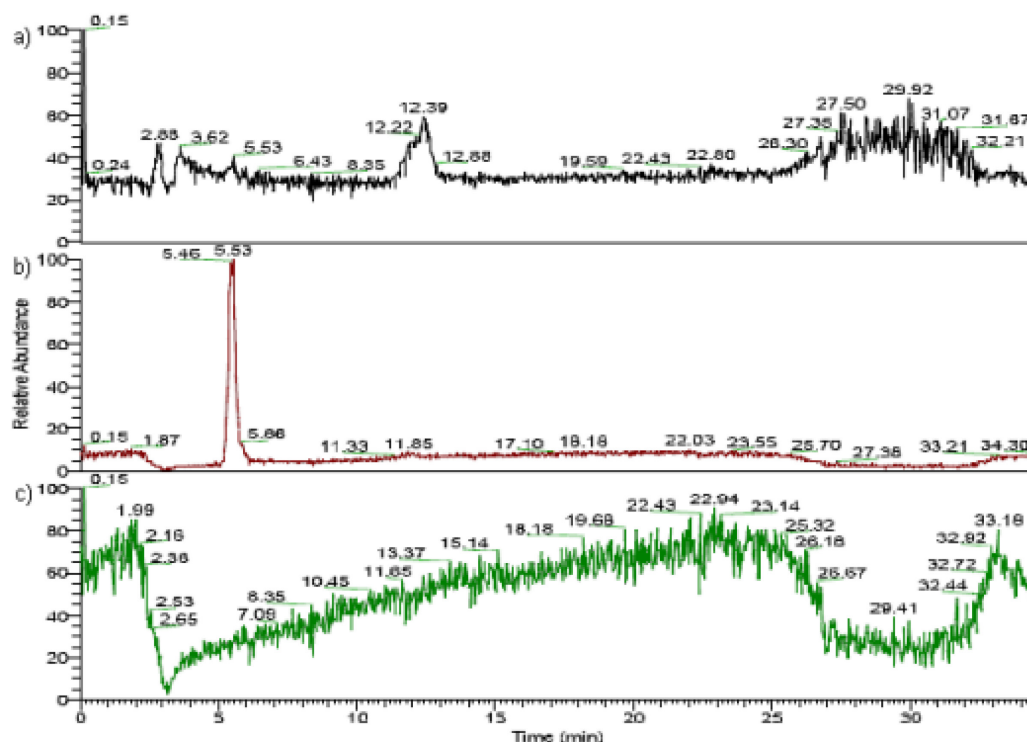


Abbildung 8-16: a) Totalionenstromchromatogramm einer Probe von 10<sup>-5</sup> M 6-MP, die für 24 h mit TPMT und S-Adenosyl-L-methionin umgesetzt wurde, b) extrahiertes Ionenstromchromatogramm für 10<sup>-5</sup> M 6-MP (m/z 153,1), c) extrahiertes Ionenstromchromatogramm für 10<sup>-5</sup> M 6-MMP (m/z 167,1).

Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit u.a. aus Gründen der Arbeitssicherheit nicht über Experimente mit einem kommerziell erhältlichen Enzym hinausgegangen werden. Wie jedoch von März et al.<sup>[262]</sup> demonstriert wurde, kann die TPMT-Aktivität in realen Blutproben von Patienten mittels SERS qualitativ nachgewiesen werden. In den hier durchgeführten Experimenten ist es darüber hinaus gelungen 6-MMP verlässlich mit SERS zu quantifizieren. Damit ist belegt, dass die in dieser Arbeit hergestellten Nanopartikelsubstrate in realen klinischen Anwendungen einsetzbar wären.



## 9. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass organosilan-basierte plasmonische Oberflächen einfach und reproduzierbar hergestellt werden können. Ihre Eigenschaften im SERS-Experiment, bedingt durch spezifische nanoskopische und daraus folgende plasmonische Eigenschaften, lassen sich gezielt beeinflussen und eröffnen zukünftige, neue Anwendungsmöglichkeiten in der Charakterisierung und Identifizierung von molekularen Zusammensetzungen und Prozessen. Diese sehr allgemeine Schlussfolgerung ergibt sich aus verschiedenen Experimenten, deren Ergebnisse in den Kapiteln 4 bis 8 diskutiert worden sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nanostrukturierte Oberflächen durch Immobilisierung verschiedener Arten von Silbernanopartikeln und Goldnanopartikeln mit Aminosilanen hergestellt. Insgesamt wurden bisher 14 plasmonische, nanostrukturierte Oberflächen generiert, die entweder aus Goldnanopartikeln, Silbernanopartikeln, oder aus verschiedenen Partikelarten bestanden. Grundsätzlich lässt die Vielseitigkeit der Kopplung über Aminosilane die Herstellung von Oberflächen vieler anderer Partikelkombinationen und –anteile zu. Durch die Verbindung von Informationen aus SERS-Experimenten und Extinktionsmessungen mit Ergebnissen aus nanoskopischen Bildgebungsverfahren kann erstmalig ein Zusammenhang zwischen den plasmonischen und den morphologischen Eigenschaften der immobilisierten Nanopartikel und dem Verstärkungsfaktor und insbesondere seiner mikroskopischen Homogenität erzeugt werden. Die plasmonischen Eigenschaften der Substrate hängen im Wesentlichen von der Größe, dem Material, der Dichte der Nanopartikel auf den Oberflächen und der Möglichkeit zur Ausbildung von Aggregaten ab. Die hohen, auf mikroskopischer Ebene sehr homogen verteilten Verstärkungen ( $\sim 10^6$ ), beobachtet für Hydroxylamin-reduzierte Silbernanopartikel und Citrat-reduzierte Goldnanopartikel, sind vergleichbar mit denen anderer flächiger SERS-Substrate, wie Inselfilme und nanolithographisch hergestellter Strukturen<sup>[179,180,181,182]</sup>, jedoch wesentlich kostengünstiger und einfacher zu erhalten. Die hohe Homogenität der Verstärkung auf mikroskopischer Ebene macht die auf den Oberflächen immobilisierten Nanopartikel zu idealen Substraten für den Einsatz als mikroskopische SERS-Sensoren. Eine zukünftige Kombination mit mikrofluidischen Strukturen und/oder weiteren Mikrostrukturierung der Oberflächen sind Anwendungen, die sich unmittelbar aus dieser Eigenschaft ergeben.

Der Einfluss von Größe, Abstand und Anordnung der Nanostrukturen auf Oberflächen auf die Verstärkung im SERS-Experiment wurde an Modellstrukturen, erzeugt mittels Elektronenstrahlolithographie, systematisch untersucht. Die Experimente mit Gold-Modellstrukturen liefern ähnliche Verstärkungsfaktoren, wie diejenigen mit organosilan-immobilisierten Goldnanopartikeln. Theoretische Betrachtungen der lokalen Felder mittels FDTD-Simulationen bestätigen, dass die Anwesenheit des Organosilans die prinzipiell realisierbare Verstärkung nicht herabsetzt. Die aus den elektrodynamischen Berechnungen gewonnenen Informationen können dazu beitragen, dass SERS-Substrate mit immobilisierten Partikeln in Zukunft noch gezielter für den Einsatz in spezifischen analytischen Anwendungen optimiert werden können.

Im Gegensatz zur technisch sehr aufwändigen und kostenintensiven Erzeugung nanolithographisch hergestellter Substrate, ist diese bei den organosilan-immobilisierten Nanopartikelflächen sehr einfach und reproduzierbar. Für noch systematischere Betrachtungen anhand lithographisch hergestellter Modellstrukturen muss eine Möglichkeit gefunden werden, den Abstand zwischen den Strukturen definiert zu verkleinern, da, wie hier gezeigt, eine anschließende Bedampfung mit Gold zur Ausbildung unregelmäßiger Strukturen führt. Eine weitere Verringerung des Abstands im Modellsystem sollte in Zukunft zum Einen durch aufwändigere Masken<sup>[266]</sup> oder durch anschließendes chemisches Wachstum erreicht werden<sup>[267]</sup>. Beim chemischen Wachstum könnte ausgenutzt werden, dass die bereits vorhandenen Metallnanostrukturen die Reduktion von Goldionen katalysieren, sodass keine neuen Partikel gebildet werden, sondern die vorhandenen Strukturen wachsen. Die Dicke der aufgewachsenen Schicht kann durch die Konzentration der Goldlösung und die Reduktionszeit genau eingestellt werden. Dies stellt eine einfache Methode dar, auch die Morphologie der immobilisierten Nanostrukturen in Zukunft gezielt zu verändern.

Kenntnisse über den Beitrag der elektromagnetischen Verstärkung zum SERS ist von großem Interesse für die Entwicklung neuer und reproduzierbarer SERS-Substrate. Mit monodispersen, Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln verschiedener Größen und Kristallviolett als Analytmolekül konnten erstmals die theoretischen Arbeiten<sup>[5,16,57,140,156]</sup> zur Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Nanopartikelgröße in Lösung experimentell bestätigt werden.

In Lösung wird eine Änderung des Verstärkungsfaktors für dieselbe Art von monodispersen Nanopartikeln in Abhängigkeit von der Analytkonzentration beobachtet. Wie hier gezeigt, führt die Immobilisierung von identischen, monodispersen Goldnanopartikeln mit Aminosilanen auf Glasoberflächen zu einer deutlichen Stabilisierung der Signale und eine Analyt-induzierte Aggregation, die zur Änderung des Verstärkungsfaktors führt, wird verhindert. Das ist Voraussetzung für die Quantifizierung von Analytmolekülen und macht die organosilan-immobilisierten Nanopartikel zu geeigneten Substraten in quantitativen Anwendungen von SERS.

Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Immobilisierung von Nanopartikeln ein simultanes Aufbringen von Gold- und Platin-, sowie von Gold- und verschiedenen Arten von Silbernanopartikeln auf Oberflächen unter Verwendung desselben Organosilans möglich macht. Damit entstehen SERS-Substrate mit neuen plasmonischen Eigenschaften und neuen Funktionalitäten.

Die Oberflächennanostruktur gemischter Gold-Silber-Substrate hängt wesentlich von der Art der verwendeten Nanopartikel und ihrem Mischungsverhältnis in der kolloidalen Lösung ab. In SERS-Experimenten mit Kristallviolett entspricht die Verstärkung je nach Mischungsverhältnis entweder der von reinen Gold- oder reinen Silbernanopartikeln, bei gleichbleibend hoher mikroskopischer Homogenität. Aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen von Analytmolekülen mit Gold und Silber<sup>[268]</sup> ermöglichen die gemischten Gold-Silber-Oberflächen Untersuchungen zur Wechselwirkung von Analytmolekülen mit Metallnanopartikeln und könnten darüber hinaus völlig neue Möglichkeiten für die Auftrennung komplexer Analytgemische eröffnen.

In einer ersten Anwendung wurden hier katalytisch-aktive Platinnanopartikel mit plasmonisch-aktiven Goldnanopartikeln in nanostrukturierten Oberflächen kombiniert. Diese besitzen sowohl plasmonische als auch katalytische Eigenschaften. Die hohe Signalstabilität erlaubt die Verfolgung der katalytischen Reduktion von *p*-Nitrothiophenol (PNTp) auf solchen gemischten Oberflächen mittels SERS. Der Einsatz von 2-Naphtalenthiole (2-NT) als interner Standard macht zudem eine relative Quantifizierung des PNTp und die Bestimmung von Reaktionskonstanten möglich. Diese Ergebnisse belegen, dass solche Oberflächen in Zukunft für die online-Detektion von oberflächenkatalysierten Reaktionen eingesetzt werden könnten, was sowohl für grundlegende Katalysatorforschung, als auch für analytische Anwendungen Bedeutung hat.

Die relative Quantifizierung von PNTTP kann auch zur Bestimmung der Reaktionskonstanten verschiedener Katalysatoren in Lösung (Platinnanopartikel, Kupfer(II)-acetylacetonat, Nickel(II)-acetylacetonat) angewendet werden. Aus den Experimenten mit Aminosilan-immobilisierten Goldnanopartikeln geht hervor, dass SERS im Vergleich zu häufig durchgeführten UV/Vis-Untersuchungen unabhängig von den optischen Eigenschaften der Katalysatoren ist und zum einen die strukturelle Charakterisierung von Intermediaten und desweiteren die Bestimmung von Reaktionskonstanten in ein und demselben Experiment ermöglicht. Das macht den Ansatz für viele Katalysatoren und für verschiedene Fragestellungen einsetzbar.

Neben der Charakterisierung dynamischer Prozesse, wie der Verfolgung von Reaktionen, können die Nanopartikeloberflächen für die Detektion molekularer Spezies eingesetzt werden. Dabei ist die hohe Signalstabilität, die gegenüber Nanopartikellösungen erreicht werden kann, von besonderem Interesse. Üblicherweise treten bei der Detektion von Neurotransmittern, wie z.B. Norepinephrin, mittels SERS große Signalschwankungen auf, bedingt durch die sehr geringe Konzentration dieser Moleküle. Durch Funktionalisierung der immobilisierten Nanopartikelsubstrate mit Glutaraldehyd kann Norepinephrin spezifisch gebunden und bis zu einer Konzentration von  $10^{-6}$  M detektiert werden. Dieses Beispiel illustriert, wie durch gezielte Funktionalisierung der Nanopartikeloberflächen Analytmoleküle der empfindlichen Detektion mittels SERS zugänglich gemacht werden können. Im Zusammenhang mit der erfolgreichen Quantifizierung von 6-Methylmercaptapurin, einem Abbauprodukt von 6-Mercaptopurin im Körper, welches zur routineanalytischen Bestimmung der Aktivität des Enzyms Thio-purinmethyltransferase in biomedizinischen Laboren herangezogen wird, zeigt sich, dass die Nanopartikelflächen prinzipiell auch im realen klinischen Umfeld einsetzbar wären. Durch die einfache Herstellung könnten die Oberflächen bei Bedarf direkt im analytischen Labor erzeugt werden.

Die Anwendung multivariater Auswertemethoden zur Klassifizierung und Identifizierung komplexer Proben ist in vielen Bereichen der analytischen Chemie gefragt. Beispiele hierfür sind Multiplexinganalysen zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Faktoren in einem Experiment, die Entwicklung von Methoden zur schnellen Identifizierung von Mikroorganismen oder Verfahren zur chemischen Bildgebung.

Voraussetzung für eine automatisierte Zuordnung von SERS-Spektren sind stabile und reproduzierbare spektrale Muster. Dass diese Voraussetzung mit organosilan-immobilisierten Nanopartikeln erfüllt werden kann, zeigt sich in dieser Arbeit an den SERS-Spektren des wässrigen Extrakts von Pollenkörnern verschiedener Pflanzenarten. Durch die erhöhte Signalstabilität ist es möglich, Pollenarten anhand von SERS-Spektren mittels Clusteranalyse und Hauptkomponentenanalyse zu klassifizieren und diejenigen Signale zu identifizieren, auf denen die Klassifizierung beruht. Dies illustriert die Möglichkeit, organosilan-immobilisierte Nanopartikel in der schnellen Klassifizierung von komplexen Molekülgemischen in realen Proben einzusetzen.

## 10. Anhang

### 10.1 Abkürzungsverzeichnis

2-NT	2-Naphtalenthiol
6-MMP	6-Methylmercaptapurin
6-MP	6-Mercaptopurin
A	Extinktion
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
APTMS	3-Aminopropyltrimethoxysilan
CCD	<i>charge coupled device</i>
CT	Ladungstransfer, <i>charge transfer</i>
Cu(acac) <sub>2</sub>	Kupfer-(II)-acetylacetonat
CV	Kristallviolett
DDA	diskrete Dipol-Näherung, <i>discrete dipole approximation</i>
EBL	Elektronenstrahlolithographie, <i>electron beam lithography</i>
EF	Verstärkungsfaktor
ESEM	Rasterelektronenmikroskopie unter Umgebungsbedingungen
f	Freiheitsgrad
FDTD	finite Differenzen-Methode, <i>finite difference time domain</i>
FEM	Finite Element-Methode, <i>finite element method</i>
FFT	Fast Fourier Transformation
G <sub>em</sub>	elektromagnetischer Intensitätsverstärkungsfaktor

---

HCA	Hierarchische Clusteranalyse
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HOPG	hochorientiertem pyrolytischen Graphit, <i>highly oriented pyrolytic graphite</i>
LA	Laserablation
MPTMS	3-Mercaptopropyltriethoxysilan
MS	Massenspektrometrie
Ni(acac) <sub>2</sub>	Nickel-(II)-acetylacetonat
NP	Nanopartikel
PATP	<i>p</i> -Aminothiophenol
PC	Hauptkomponente, <i>Principal Component</i>
PCA	Hauptkomponentenanalyse, <i>Principal Component Analysis</i>
PML	<i>perfectly matched layer</i>
PMMA	Polymethylmethacrylat
PNTP	<i>p</i> -Nitrothiophenol
PW	Prüfwert
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmass
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung, <i>Small-Angle X-ray Scattering</i>
SERS	oberflächenverstärkte Ramanstreuung, <i>Surface-enhanced Raman scattering</i>
SFM	Rasterkraftmikroskopie
STM	Rastertunnelmikroskopie

TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TPMT	Thiopurin-S-Methyltransferase
XANES	Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie



## 10.2 Publikationsverzeichnis

### Originalartikel

**Joseph, V.**; Schulte, F.; Rooch, H.; Feldmann, I.; Dörfel, I.; Österle, W.; Panne, U.; Kneipp, J., Surface-enhanced Raman scattering with silver nanostructures generated in situ in a sporopollenin biopolymer matrix. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 3236 - 3238.

**Joseph, V.**; Matschulat, A.; Polte, J.; Rolf, S.; Emmerling, F.; Kneipp, J., SERS enhancement of gold nanospheres of defined size. *J. Raman Spec.* **2011**, 42, 1736 - 1742

Simo, A.; **Joseph, V.**; Fenger, R.; Kneipp, J.; Rademann, K., Long-Term Stable Silver Subsurface Ion-Exchanged Glasses for SERS Applications. *ChemPhysChem* **2011**, 12, 1683 – 1688

**Joseph, V.**; Gensler, M; Seifert, S.; Gernert, U.; Rabe, J.P.; Kneipp, J., Nanoscopic Properties and Application of Mix-and-Match Plasmonic Surfaces for Microscopic SERS. *J. Phys. Chem. C* **2012**, 116, 6859 - 6865

**Joseph, V.**; Engelbrekt, C.; Zhang, J.; Gernert, U.; Ulstrup, J.; Kneipp, J., Catalytically active and plasmonic mix-and-match nanoparticle surfaces for in situ determination of reaction kinetics by SERS (zur Publikation eingereicht)

Kadkhodazadeh, S.; **Joseph, V.**, Kneipp, H.; Wagner, J.B.; Kneipp, J.; Kneipp, K., Electron energy-loss - and one- and two-photon excited SERS probing of "hot" plasmonic silver nanoaggregates. (zur Publikation eingereicht)

**Joseph, V.**; Kneipp, J., Quantitative detection of 6-MP using SERS on gold nanoparticle surfaces (in Vorbereitung)

**Joseph, V.**; Kneipp, J.; Leosson, K., Electron beam lithographic gold nanoparticles as template for nanoparticle growth: Plasmonic properties and SERS enhancement (in Vorbereitung)

Lasogga, L.; Bricks, J.; **Joseph, V.**; Kneipp, J.; Rettig, W., Probing the Mechanism of Colour Vision: A Model Compound Study Comparing Optical and Raman Spectroscopy (in Vorbereitung)

Buchkapitel

Schulte, F.; **Joseph, V.**; Panne, U.; Kneipp, J., Applications of Raman and Surface-enhanced Raman scattering to the analysis of eukaryotic samples. In: Matousek, P.; Morris, M. D. (eds.), Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields, Springer, Heidelberg, Berlin, 2010.

Vorträge auf internationalen Konferenzen

**Joseph, V.**; Kneipp, J., Surface-enhanced Raman scattering for bioanalytical chemistry, Analytica, München, 2010

**Joseph, V.**; Kneipp, J., Development and characterisation of new planar SERS sensors for detection of catalytic activity and other applications. Molecular Plasmonics, Jena, 2011

**Joseph, V.**; Kneipp, J., Development and characterisation of new planar SERS sensors for detection of catalytic activity and other applications. Spectroscopy, Rostock, 2011

Poster auf internationalen Konferenzen

**Joseph, V.**; Schulte, F.; Matschulat, A.; Feldmann, I.; Panne, U.; Kneipp, J., International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS), London, 2008

**Joseph, V.**; Dörfel, I.; Kneipp, J., 3. Interdisziplinäre Doktorandentagung Analytik, Attendorn, 2009.

**Joseph, V.**; Feldmann, I.; Dörfel, I.; Panne, U.; J. Kneipp, Anakon, Berlin, 2009.

**Joseph, V.**; Kneipp, J. FTIR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics, Berlin, 2009

**Joseph, V.**; Kneipp, J., Analytica, München, 2010

**Joseph, V.**; Kneipp, J., Anakon, Zürich, 2011 (Posterpreis)

**Joseph, V.**; Kneipp, J., European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM), Coimbra, 2011

**Joseph, V.;** Kneipp, J., FTIR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics, Berlin, 2011

### **10.3 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit mit dem Titel „Nanopartikel auf Oberflächen – Charakterisierung und Anwendung in der oberflächenverstärkten Raman-Streuung“ selbstständig unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, 25.04.12

---

## Literaturverzeichnis

- [1] Kneipp, J.; Kneipp, H.; Wittig, B. und Kneipp, K. (2007): One- and Two-Photon Excited Optical pH Probing for Cells Using Surface-Enhanced Raman and Hyper-Raman Nanosensors, *Nano Lett.* **7**, 9, Seite 2819-2823
- [2] Matschulat, A.; Drescher, D. und Kneipp, J. (2010): Surface-Enhanced Raman Scattering Hybrid Nanoprobe Multiplexing and Imaging in Biological Systems, *ACS Nano* **4**, 6, Seite 3259-3269
- [3] Grisel, R.; Weststrate, K.J.; Gluhoi, A. und Nieuwenhuys, B.E. (2002): Catalysis by gold nanoparticles, *Gold Bull.* **35**, 2, Seite 39-45
- [4] Panigrahi, S.; Basu, S.; Praharaj, S.; Pande, S.; Jana, S.; Pal, A.; Ghosh, S.K. und Pal, T. (2007): Synthesis and Size-Selective Catalysis by Supported Gold Nanoparticles: Study on Heterogeneous and Homogeneous Catalytic Process, *J. Phys. Chem. C* **111**, 12, Seite 4596-4605
- [5] Wang, D. S. und Kerker, M. (1981): Enhanced Raman scattering by molecules adsorbed at the surface of colloidal spheroids, *Phys. Rev. B* **24**, 4, Seite 1777
- [6] Creighton, J. A.; Blatchford, C. G. und Albrecht, M. G. (1979): Plasma Resonance Enhancement of Raman-Scattering by Pyridine Adsorbed on Silver or Gold Sol Particles of Size Comparable to the Excitation Wavelength, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **75**, Seite 790-798
- [7] Gersten, J. und Nitzan, A. (1980): Electromagnetic theory of enhanced Raman scattering by molecules adsorbed on rough surfaces, *J. Chem. Phys.* **73**, 7, Seite 3023-3037
- [8] Kneipp, K.; Kneipp, H.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; und Feld, M. S.; (2002): Surface-enhanced Raman scattering and biophysics, *J. Phys.* **14**, 18, Seite R597–R624
- [9] Moskovits, M. (2005): Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective, *J. Raman Spec.* **36**, 6-7, Seite 485-496
- [10] Kneipp, K.; Kneipp, H.; Manoharan, R.; Hanlon, E.B.; Itzkan, I.; Dasari, R.R. und Feld, M.S. (1998): Extremely Large Enhancement Factors in Surface-Enhanced Raman Scattering for Molecules on Colloidal Gold Clusters, *Appl. Spec.* **52**, 12, Seite 1493-1497
- [11] Kneipp, K.; Kneipp, H. und Kneipp, J. (2006): Surface-enhanced Raman scattering in local optical fields of silver and gold nanoaggregates - From single-molecule Raman spectroscopy to ultrasensitive probing in live cells, *Acc. Chem. Res.* **39**, 7, Seite 443-450

- [12] Kneipp, J.; Kneipp, H. und Kneipp, K. (2008): SERS - a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics, *Chem. Soc. Rev.* **37**, 5, Seite 1052-1060
- [13] Camden, J. P.; Dieringer, J. A.; Zhao, J. und Van Duyne, R. P. (2008): Controlled Plasmonic Nanostructures for Surface-Enhanced Spectroscopy and Sensing, *Acc. Chem. Res.* **41**, 12, Seite 1653-1661
- [14] Haynes, C.L.; Yonzon, C.R.; Zhang, X. und Van Duyne, R.P. (2005): Surface-enhanced Raman sensors: early history and the development of sensors for quantitative biowarfare agent and glucose detection, *J. Raman Spec.* **36**, 6-7, Seite 471-484
- [15] Vo-Dinh, T. (1998): Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures, *Trends Anal. Chem.* **17**, 8-9, Seite 557-582
- [16] Kerker, M.; Wang, D.S. und Chew, H. (1980): Surface Enhanced Raman-Scattering (Sers) by Molecules Adsorbed at Spherical-Particles, *Appl. Opt.* **19**, 19, Seite 3373-3388
- [17] McFarland, A.D.; Young, M.A.; Dieringer, J.A. und Van Duyne, R.P. (2005): Wavelength-Scanned Surface-Enhanced Raman Excitation Spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* **109**, 22, Seite 11279-11285
- [18] Tian, Z.-Q.; Yang, Z.-L.; Ren, B.; Li, J.-F.; Zhang, Y.; Lin, X.-F.; Hu, J.-W. und Wu, D.-Y. (2006): Surface-enhanced Raman scattering from transition metals with special surface morphology and nanoparticle shape, *Faraday Discuss.* **132**, Seite 159-170
- [19] Blatchford, C. G.; Campbell, J. R. und Creighton, J. A. (1982): Plasma Resonance Enhanced Raman-Scattering by Adsorbates on Gold Colloids - the Effects of Aggregation, *Surf. Sci.* **120**, 2, Seite 435-455
- [20] Lin, X.-M.; Cui, Y.; Xu, Y.-H.; Ren, B. und Tian, Z.-Q. (2009): Surface-enhanced Raman spectroscopy: substrate-related issues, *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 7, Seite 1729-1745
- [21] Banholzer, M.J.; Millstone, J.E.; Qin, L. und Mirkin, C.A. (2008): Rationally designed nanostructures for surface-enhanced Raman spectroscopy, *Chem. Soc. Rev.* **37**, 5, Seite 885-897
- [22] Brown, R.J.C. und Milton, M.J.T. (2008): Nanostructures and nanostructured substrates for surface-enhanced Raman scattering (SERS), *J. Raman Spectrosc.* **39**, 10, Seite 1313-1326
- [23] Stiles, P.L.; Dieringer, J.A.; Shah, N.C. und Van Duyne, R.P. (2008): Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Ann. Rev. Anal. Chem.* **1**, 1, Seite 601-626

- 
- [24] Lee, P. C. und Meisel, D. (1982): Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols, *J. Phys. Chem.* **86**, 17, Seite 3391-3395
- [25] Sau, T.K. und Murphy, C.J. (2004): Room Temperature, High-Yield Synthesis of Multiple Shapes of Gold Nanoparticles in Aqueous Solution, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 28, Seite 8648-8649
- [26] Gutes, A.; Carraro, C. und Maboudian, R. (2009): Silver Nanodesert Rose as a Substrate for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Appl. Mater. Interf.* **1**, 11, Seite 2551-2555
- [27] Jana, Nikhil R.; Gearheart, Latha und Murphy, Catherine J. (2001): Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods, *J. Phys. Chem. B* **105**, 19, Seite 4065-4067
- [28] Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A. und Chan, W. C. W. (2006): Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, *Nano Lett.* **6**, 4, Seite 662-668
- [29] Kneipp, J.; Kneipp, H.; McLaughlin, M.; Brown, D. und Kneipp, K. (2006): In Vivo Molecular Probing of Cellular Compartments with Gold Nanoparticles and Nanoaggregates, *Nano Lett.* **6**, 10, Seite 2225-2231
- [30] Kneipp, J.; Kneipp, H.; Rice, W.L. und Kneipp, K. (2005): Optical probes for biological applications based on surface-enhanced Raman scattering from indocyanine green on gold nanoparticles, *Anal. Chem.* **77**, 8, Seite 2381-2385
- [31] Alvarez-Puebla, R.A.; Arceo, E.; Goulet, P.J.G.; Garrido, J.J. und Aroca, R.F. (2005): Role of Nanoparticle Surface Charge in Surface-Enhanced Raman Scattering, *J. Phys. Chem. B* **109**, 9, Seite 3787-3792
- [32] Munro, C. H.; Smith, W. E.; Garner, M.; Clarkson, J. und White, P. C. (1995): Characterization of the Surface of a Citrate-Reduced Colloid Optimized for Use as a Substrate for Surface-Enhanced Resonance Raman-Scattering, *Langmuir* **11**, 10, Seite 3712-3720
- [33] Shipway, A.N.; Lahav, M.; Gabai, R. und Willner, I. (2000): Investigations into the Electrostatically Induced Aggregation of Au Nanoparticles, *Langmuir* **16**, 23, Seite 8789-8795
- [34] Shalaev, V.M. (1996): Electromagnetic properties of small-particle composites, *Physics Reports* **272**, 2-3, Seite 61-137
- [35] Li, K. R.; Stockman, M. I. und Bergman, D. J. (2003): Self-similar chain of metal nanospheres as an efficient nanolens, *Phys. Rev. Lett.* **91**, 22, Seite 227402-1-227402-4

- [36] Kerker, M.; Siiman, O. und Wang, D. S. (1984): Effect of aggregates on extinction and surface-enhanced Raman scattering spectra of colloidal silver, *J. Phys. Chem.* **88**, 15, Seite 3168-3170
- [37] Bell, S.E.J. und Sirimuthu, N.M. (2004): Rapid, quantitative analysis of ppm/ppb nicotine using surface-enhanced Raman scattering from polymer-encapsulated Ag nanoparticles (gel-colls), *Analyst* **129**, 11, Seite 1032-1036
- [38] Stewart, A. und Bell, S.E.J. (2011): Modification of Ag nanoparticles with mixed thiols for improved SERS detection of poorly adsorbing target molecules: detection of MDMA, *Chem. Commun.* **47**, 15, Seite 4523-4525
- [39] Lyandres, O.; Shah, N.C.; Yonzon, C.R.; Walsh, J.T.; Glucksberg, M.R. und Van Duyne, R.P. (2005): Real-Time Glucose Sensing by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Bovine Plasma Facilitated by a Mixed Decanethiol/Mercaptohexanol Partition Layer, *Anal. Chem.* **77**, 19, Seite 6134-6139
- [40] Alvarez-Puebla, R.A. und Liz-Marzan, L.M. (2012): Traps and cages for universal SERS detection, *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1, Seite 43-51
- [41] Albrecht, M. G. und Creighton, J. A. (1977): Anomalously Intense Raman-Spectra of Pyridine at a Silver Electrode, *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 15, Seite 5215-5217
- [42] Chen, C. Y. und Burstein, E. (1980): Giant Raman Scattering by Molecules at Metal-Island Films, *Phys. Rev. Lett.* **45**, 15, Seite 1287-1291
- [43] Liu, G.L. und Lee, L.P. (2005): Nanowell surface enhanced Raman scattering arrays fabricated by soft-lithography for label-free biomolecular detections in integrated microfluidics, *Appl. Phys. Lett.* **87**, 7, Seite 074101 (3 pages)
- [44] Jensen, T.R.; Malinsky, M.; Duval, M.; Haynes, C.L. und Van Duyne, R.P. (2000): Nanosphere Lithography: Tunable Localized Surface Plasmon Resonance Spectra of Silver Nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* **104**, 45, Seite 10549-10556
- [45] Lucht, S.; Murphy, T.; Schmidt, H. und Kronfeldt, H.D. (2000): Optimized recipe for sol-gel-based SERS substrates, *J. Raman Spec.* **31**, 11, Seite 1017-1022
- [46] Chen, Y.; Karvonen, L.; Säynätjoki, A.; Ye, C.; Tervonen, A. und Honkanen, S. (2011): Ag nanoparticles embedded in glass by two-step ion exchange and their SERS application, *Opt. Mater. Express* **1**, 2, Seite 164-172
- [47] Karabıçak, S.; Kaya, M.; Vo-Dinh, T. und Volkan, M. (2008): Silver Nanoparticle-Doped Polyvinyl Alcohol Coating as a Medium for Surface-Enhanced Raman Scattering Analysis, *J. Nanosci. Nanotech.* **8**, 2, Seite 955-960



- 
- [48] Matthias, H.; Domenicantonio, G. D.; Eugster, O. und Félix, C. (2007): Instability of Ag nanoparticles in SiO<sub>2</sub> at ambient conditions, *Nanotech.* **18**, 1, Seite 015702 (4 pages)
- [49] Goss, C.A.; Charych, D.H. und Majda, M. (1991): Application of (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane as a molecular adhesive in the fabrication of vapor-deposited gold electrodes on glass substrates, *Anal. Chem.* **63**, 1, Seite 85-88
- [50] Yee, J. K.; Parry, D. B.; Caldwell, K. D. und Harris, J. M. (1991): Modification of Quartz Surfaces Via Thiol Disulfide Interchange, *Langmuir* **7**, 2, Seite 307-313
- [51] Grabar, K.C.; Freeman, R.G.; Hommer, M.B. und Natan, M.J. (1995): Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers, *Anal. Chem.* **67**, 4, Seite 735-743
- [52] Freeman, R.G.; Grabar, K.C.; Allison, K.J.; Bright, R.M.; Davis, J.A.; Guthrie, A.P.; Hommer, M.B.; Jackson, M.A.; Smith, P.C.; Walter, D.G. und Natan, M.J. (1995): Self-Assembled Metal Colloid Monolayers: An Approach to SERS Substrates, *Science* **267**, 5204, Seite 1629-1632
- [53] Hajduková, N.; Procházka, M.; Stepánek, J. und Spírková, M. (2007): Chemically reduced and laser-ablated gold nanoparticles immobilized to silanized glass plates: Preparation, characterization and SERS spectral testing, *Coll. Surf. A* **301**, 1-3, Seite 264-270
- [54] Molnár, P. und Procházka, M. (2007): SER(R)S of porphyrins on Ag nanoparticles immobilized by silane: a unique way to obtain free-base porphyrin spectra, *J. Raman Spec.* **38**, 7, Seite 799-801
- [55] Chumanov, G.; Sokolov, K.; Gregory, B.W. und Cotton, T.M. (1995): Colloidal metal films as a substrate for surface-enhanced spectroscopy, *J. Phys. Chem.* **99**, 23, Seite 9466-9471
- [56] Fan, M. und Brolo, A.G. (2009): Silver nanoparticles self assembly as SERS substrates with near single molecule detection limit, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 34, Seite 7381-7389
- [57] Zeman, E.J. und Schatz, G.C. (1987): An accurate electromagnetic theory study of surface enhancement factors for silver, gold, copper, lithium, sodium, aluminum, gallium, indium, zinc, and cadmium, *J. Phys. Chem.* **91**, 3, Seite 634-643
- [58] Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Perelman, L.T.; Itzkan, I.; Dasari, R.R. und Feld, M.S. (1997): Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), *Phys. Rev. Lett.* **78**, 9, Seite 1667
- [59] Freunscht, P.; Van Duyne, R.P. und Schneider, S. (1997): Surface-enhanced Raman spectroscopy of trans-stilbene adsorbed on platinum- or self-assembled

- monolayer-modified silver film over nanosphere surfaces, Chem. Phys. Lett. **281**, 4-6, Seite 372-378
- [60] Sulk, R.A.; Corcoran, R.C. und Carron, K.T. (1999): Surface-Enhanced Raman Scattering Detection of Amphetamine and Methamphetamine by Modification with 2-Mercaptonicotinic Acid Appl. Spec. **53**, 8, Seite 954-959
- [61] Shafer-Peltier, K.E.; Haynes, C.L.; Glucksberg, M.R. und Van Duyne, R.P. (2003): Toward a Glucose Biosensor Based on Surface-Enhanced Raman Scattering, J. Am. Chem. Soc. **125**, 2, Seite 588-593
- [62] Yang, L.; Ma, L.; Chen, G.; Liu, J. und Tian, Z.-Q. (2010): Ultrasensitive SERS Detection of TNT by Imprinting Molecular Recognition Using a New Type of Stable Substrate, Chem. Eur. J. **16**, 42, Seite 12683-12693
- [63] Fleischmann, M.; Hendra, P. J. und McQuillan, A.J. (1974): Raman-Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode, Chem. Phys. Lett. **26**, 2, Seite 163-166
- [64] Jeanmaire, D. L. und Vanduyne, R. P. (1977): Surface Raman Spectroelectrochemistry .1. Heterocyclic, Aromatic, and Aliphatic-Amines Adsorbed on Anodized Silver Electrode, J. Electroanal. Chem. **84**, 1, Seite 1-20
- [65] Moskovits, M. (1978): Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals, J. Chem. Phys. **69**, 9, Seite 4159-4161
- [66] Messinger, B.J.; von Raben, K.U.; Chang, R.K. und Barber, P.W. (1981): Local fields at the surface of noble-metal microspheres, Phys. Rev. B **24**, 2, Seite 649-657
- [67] Tang, J. und Albrecht, A.C. (1970), Szymanski, H.A., Raman Spectroscopy: Theory and Practice (Band 2), Plenum Press, New York
- [68] Weitz, D.; Garoff, S.; Gersten, J. und Nitzan, A. (1983): The enhancement of Raman scattering, resonance Raman scattering, and fluorescence from molecules adsorbed on a rough silver surface, J. Chem. Phys. **78**, 9, Seite 5324-5338
- [69] Mie, G. (1908): Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen, Ann. Phys. **25**, 3, Seite 377-445
- [70] Creighton, J. A. (1983): Surface raman electromagnetic enhancement factors for molecules at the surface of small isolated metal spheres: The determination of adsorbate orientation from sers relative intensities, Surf. Sci. **124**, 1, Seite 209-219

- 
- [71] Markel, V. A.; Shalae, V. M.; Zhang, P.; Huynh, W.; Tay, L.; Haslett, T. L. und Moskovits, M. (1999): Near-field optical spectroscopy of individual surface-plasmon modes in colloid clusters, *Phys. Rev. B* **59**, 16, Seite 10903 - 10909
- [72] Moskovits, M. (1985): Surface-Enhanced Spectroscopy, *Rev. Mod. Phys.* **57**, 3, Seite 783-826
- [73] Otto, A.; Mrozek, I.; Grabhorn, H. und Akemann, W. (1992): Surface-enhanced Raman scattering, *J. Phys. Condens. Mat.* **4**, 5, Seite 1143-1212
- [74] Schatz, G.C. (1984): Theoretical studies of surface enhanced Raman scattering, *Acc. Chem. Res.* **17**, 10, Seite 370-376
- [75] Otto, A.; Billmann, J.; Eickmans, J.; Erturk, U. und Pettenkofer, C. (1984): The "Adatom Model" of SERS (Surface Enhanced Raman-Scattering) - the Present Status, *Surf. Sci.* **138**, 2-3, Seite 319-338
- [76] Shibamoto, K.; Katayama, K. und Sawada, T. (2003): Fundamental processes of surface enhanced Raman scattering detected by transient reflecting grating spectroscopy, *J. Photochem. Photobiol. A* **158**, 2-3, Seite 105-110
- [77] Campion, A.; Ivanecy, J.E.; Child, C.M. und Foster, M. (1995): On the Mechanism of Chemical Enhancement in Surface-Enhanced Raman Scattering, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 47, Seite 11807-11808
- [78] Nikoobakht, B.; Wang, J. P. und El-Sayed, M. A. (2002): Surface-enhanced Raman scattering of molecules adsorbed on gold nanorods: off-surface plasmon resonance condition, *Chem. Phys. Lett.* **366**, 1-2, Seite 17-23
- [79] Zhao, L. L.; Jensen, L. und Schatz, G. C. (2006): Pyridine-Ag-20 cluster: A model system for studying surface-enhanced Raman scattering, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9, Seite 2911-2919
- [80] Zhao, L.L.; Jensen, L. und Schatz, G.C. (2006): Surface-Enhanced Raman Scattering of Pyrazine at the Junction between Two Ag<sub>20</sub> Nanoclusters, *Nano Lett.* **6**, 6, Seite 1229-1234
- [81] Lombardi, J. R.; Birke, R. L.; Lu, T. H. und Xu, J. (1986): Charge-Transfer Theory of Surface Enhanced Raman-Spectroscopy - Herzberg-Teller Contributions, *J. Chem. Phys.* **84**, 8, Seite 4174-4180
- [82] Felidj, N.; Aubard, J.; Levi, G.; Krenn, J. R.; Hohenau, A.; Schider, G.; Leitner, A. und Aussenegg, F. R. (2003): Optimized surface-enhanced Raman scattering on gold nanoparticle arrays, *Appl. Phys. Lett.* **82**, 18, Seite 3095-3097

- [83] Liao, P. F.; Bergman, J. G.; Chemla, D. S.; Wokaun, A.; Melngailis, J.; Hawryluk, A. M. und Economou, N. P. (1981): Surface-Enhanced Raman-Scattering from Microlithographic Silver Particle Surfaces, *Chem. Phys. Lett.* **82**, 2, Seite 355-359
- [84] Allen, C.S.; Schatz, G.C. und Vanduyne, R.P. (1980): Tunable Laser Excitation Profile of Surface Enhanced Raman-Scattering from Pyridine Adsorbed on a Copper Electrode Surface, *Chem. Phys. Lett.* **75**, 2, Seite 201-205
- [85] Haynes, C.L. und Van Duyne, R.P. (2003): Plasmon-Sampled Surface-Enhanced Raman Excitation Spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* **107**, 30, Seite 7426-7433
- [86] Link, S. und El-Sayed, M. A. (1999): Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* **103**, 21, Seite 4212-4217
- [87] Link, Stephan und El-Sayed, Mostafa A. (2003): Optical Properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **54**, 1, Seite 331-366
- [88] Kneipp, K.; Dasari, R.R. und Wang, Y. (1994): Near-Infrared Surface-Enhanced Raman Scattering (NIR SERS) on Colloidal Silver and Gold, *Appl. Spec.* **48**, Seite 951-955
- [89] Zheng, K. H.; Chou, Y. C.; Wu, Y. J. und Lee, Y. T. (2010): Raman spectra of benzoic acid enhanced by the silver nanoparticles of various sizes, *J. Raman Spec.* **41**, 6, Seite 632-635
- [90] Le Ru, E. C.; Blackie, E.; Meyer, M. und Etchegoin, P. G. (2007): Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study, *J. Phys. Chem. C* **111**, 37, Seite 13794-13803
- [91] Haiss, W.; Thanh, N.T.K.; Aveyard, J. und Fernig, D.G. (2007): Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra, *Anal. Chem.* **79**, 11, Seite 4215-4221
- [92] Johnson, P. B. und Christy, R. W. (1972): Optical Constants of the Noble Metals, *Phys. Rev. B* **6**, 12, Seite 4370
- [93] Kreibig, U. und Genzel, L. (1985): Optical absorption of small metallic particles, *Surf. Sci.* **156**, Part 2, Seite 678-700
- [94] Laor, U. und Schatz, G.C. (1981): The role of surface roughness in surface enhanced raman spectroscopy (SERS): the importance of multiple plasmon resonances, *Chem. Phys. Lett.* **82**, 3, Seite 566-570

- 
- [95] Jensen, T.; Kelly, L.; Lazarides, A. und Schatz, G.C. (1999): Electrodynamics of Noble Metal Nanoparticles and Nanoparticle Clusters, *J. Cluster Sci.* **10**, 2, Seite 295-317
- [96] Chumanov, G.; Sokolov, K. und Cotton, T.M. (1996): Unusual Extinction Spectra of Nanometer-Sized Silver Particles Arranged in Two-Dimensional Arrays, *J. Phys. Chem.* **100**, 13, Seite 5166-5168
- [97] Weitz, D. A.; Garoff, S. und Gramila, T. J. (1982): Excitation spectra of surface-enhanced Raman scattering on silver-island films, *Opt. Lett.* **7**, 4, Seite 168-170
- [98] Grabar, K.C.; Brown, K.R.; Keating, C.D.; Stranick, S.J.; Tang, S.-L. und Natan, M.J. (1997): Nanoscale Characterization of Gold Colloid Monolayers: A Comparison of Four Techniques, *Anal. Chem.* **69**, 3, Seite 471-477
- [99] Cañamares, M. V.; Garcia-Ramos, J. V.; Gómez-Varga, J. D.; Domingo, C. und Sanchez-Cortes, S. (2005): Comparative Study of the Morphology, Aggregation, Adherence to Glass, and Surface-Enhanced Raman Scattering Activity of Silver Nanoparticles Prepared by Chemical Reduction of Ag<sup>+</sup> Using Citrate and Hydroxylamine, *Langmuir* **21**, 18, Seite 8546-8553
- [100] Van Duyne, R. P.; Hulteen, J. C. und Treichel, D. A. (1993): Atomic-Force Microscopy and Surface-Enhanced Raman-Spectroscopy .1. Ag Island Films and Ag Film over Polymer Nanosphere Surfaces Supported on Glass, *J. Chem. Phys.* **99**, 3, Seite 2101-2115
- [101] Kotlarchyk, M.; Stephens, R.B. und Huang, J.S. (1988): Study of Schultz distribution to model polydispersity of microemulsion droplets, *J. Phys. Chem.* **92**, 6, Seite 1533-1538
- [102] Polte, J.; Ahner, T. T.; Delissen, F.; Sokolov, S.; Emmerling, F.; Thünemann, A.F. und Kraehnert, R. (2010): Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled In Situ XANES and SAXS Evaluation, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 4, Seite 1296-1301
- [103] Polte, J.; Erler, R.; Thünemann, A.F.; Sokolov, S.; Ahner, T. T.; Rademann, K.; Emmerling, F. und Kraehnert, R. (2010): Nucleation and Growth of Gold Nanoparticles Studied via in situ Small Angle X-ray Scattering at Millisecond Time Resolution, *ACS Nano* **4**, 2, Seite 1076-1082
- [104] Polte, J.; Herder, M.; Erler, R.; Rolf, S.; Fischer, A.; Würth, C.; Thünemann, A.F.; Kraehnert, R. und Emmerling, F. (2010): Mechanistic insights into seeded growth processes of gold nanoparticles, *Nanoscale* **2**, 11, Seite 2463-2469
- [105] Cant, N.E.; Critchley, K.; Zhang, H.-L. und Evans, S.D. (2003): Surface functionalisation for the self-assembly of nanoparticle/polymer multilayer films, *Thin Solid Films* **426**, 1-2, Seite 31-39

- [106] Alvarez-Puebla, R.A. und Aroca, R.F. (2009): Synthesis of Silver Nanoparticles with Controllable Surface Charge and Their Application to Surface-Enhanced Raman Scattering, *Anal. Chem.* **81**, 6, Seite 2280-2285
- [107] Stern, O. (1924): The theory of the electrolytic double shift, *Z. Elektrochem. Angew. Phys. Chem.* **30**, Seite 508-516
- [108] Smoluchowski, M.M. (1903): Contribution à la théorie de l'endosmose électrique et de quelques phénomènes corrélatifs, *Bull. Int. Acad. Sci. Cracovie*
- [109] Quinten, M. (2001): Local fields close to the surface of nanoparticles and aggregates of nanoparticles, *Appl. Phys. B* **73**, 3, Seite 245-255
- [110] Teixeira, F.L. (2007): FDTD/FETD Methods: A Review on Some Recent Advances and Selected Applications, *J. Microwaves Optoelectron.* **6**, 1, Seite 83-95
- [111] Schatz, G.C. (2001): Electrodynamics of nonspherical noble metal nanoparticles and nanoparticle aggregates, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **573**, 1-3, Seite 73-80
- [112] Yee, K. (1966): Numerical solution of initial boundary value problems involving maxwell's equations in isotropic media, *IEEE T. Antenn. Propag.* **14**, 3, Seite 302-307
- [113] Frens, G. (1973): Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nat. Phys. Sci* **241**, 105, Seite 20-22
- [114] Horisberger, M. und Rosset, J. (1977): Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy, *J. Histochem. Cytochem.* **25**, 4, Seite 295-305
- [115] Turkevich, J.; Stevenson, P. C. und Hillier, J. (1951): A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold, *Discuss. Faraday Soc.*, **11**, Seite 55-75
- [116] Leopold, N. und Lendl, B. (2003): A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *J. Phys. Chem. B* **107**, 24, Seite 5723-5727
- [117] Radziuk, D.; Shchukin, D.G.; Skirtach, A.; Mohwald, H. und Sukhorukov, G. (2007): Synthesis of Silver Nanoparticles for Remote Opening of Polyelectrolyte Microcapsules, *Langmuir* **23**, 8, Seite 4612-4617
- [118] Engelbrekt, C.; Sørensen, K.H.; Lübcke, T.; Zhang, J.; Li, Q.; Pan, C.; Bjerrum, N.J. und Ulstrup, J. (2010): 1.7 nm Platinum Nanoparticles: Synthesis with

- Glucose Starch, Characterization and Catalysis, *ChemPhysChem* **11**, 13, Seite 2844-2853
- [119] Chang, T. H. P. (1975): Proximity Effect in Electron-Beam Lithography, *Journal of Vacuum Science & Technology* **12**, 6, Seite 1271-1275
- [120] Bowfield, A.; Smith, C. I.; Dolan, G. J.; Cuquerella, M. C.; Mansley, C. P. und Weightman, P. (2009): The Structure of Adenine Adsorbed at Sub-Saturation Coverage at Au(110)/Electrolyte Interfaces, *e-J. Surf. Sci. Nanotech.* **7**, Seite 225-229
- [121] Kudelski, A. (2005): Raman studies of rhodamine 6G and crystal violet sub-monolayers on electrochemically roughened silver substrates: Do dye molecules adsorb preferentially on highly SERS-active sites?, *Chem. Phys. Lett.* **414**, 4-6, Seite 271-275
- [122] Gole, A.; Sainkar, S.R. und Sastry, M. (2000): Electrostatically Controlled Organization of Carboxylic Acid Derivatized Colloidal Silver Particles on Amine-Terminated Self-Assembled Monolayers, *Chem. Mater.* **12**, 5, Seite 1234-1239
- [123] Madueño, R.; Sevilla, J. M.; Pineda, T.; Román, A. J. und Blázquez, M. (2001): A voltammetric study of 6-mercaptapurine monolayers on polycrystalline gold electrodes, *J. Electroanal. Chem.* **506**, 2, Seite 92-98
- [124] Pradhan, N.; Pal, A. und Pal, T. (2002): Silver nanoparticle catalyzed reduction of aromatic nitro compounds, *Coll. Surf. A* **196**, 2-3, Seite 247-257
- [125] Ghosh, S.K.; Mandal, M.; Kundu, S.; Nath, S. und Pal, T. (2004): Bimetallic Pt-Ni nanoparticles can catalyze reduction of aromatic nitro compounds by sodium borohydride in aqueous solution, *Appl. Catal. A* **268**, 1-2, Seite 61-66
- [126] Khalavka, Y.; Becker, J. und Sönnichsen, C. (2009): Synthesis of Rod-Shaped Gold Nanorattles with Improved Plasmon Sensitivity and Catalytic Activity, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5, Seite 1871-1875
- [127] Mandel, J. (1984): *The Statistical Analysis of Experimental Data*, DOVER Publ Inc., ISBN: 0486646661
- [128] Szeghalmi, A.V.; Leopold, L.; Pînzaru, S.; Chis, V.; Silaghi-Dumitrescu, I.; Schmitt, M.; Popp, J. und Kiefer, W. (2005): Adsorption of 6-mercaptapurine and 6-mercaptapurine riboside on silver colloid: a pH dependent surface enhanced Raman spectroscopy and density functional theory study. Part I. 6-Mercaptapurine, *J. Mol. Struct.* **735-736**, Seite 103-113
- [129] Angebrannt, M.J. und Winefordner, J.D. (1992): Surface enhanced Raman spectroscopy on copper hydrosols, *Talanta* **39**, 6, Seite 569-572

- [130] Kudelski, A.; Janik-Czachor, M.; Bukowska, J.; Dolata, M. und Szummer, A. (1999): Surface-enhanced Raman scattering (SERS) on copper electrodeposited under nonequilibrium conditions, *J. Mol. Struct.* **482-483**, Seite 245-248
- [131] Yaffe, N. R.; Ingram, A.; Graham, D. und Blanch, E. W. (2010): A multi-component optimisation of experimental parameters for maximising SERS enhancements, *J. Raman Spec.* **41**, 6, Seite 618-623
- [132] Tsuji, T.; Iryo, K.; Watanabe, N. und Tsuji, M. (2002): Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in solution: influence of laser wavelength on particle size, *Appl. Surf. Sci.* **202**, 1-2, Seite 80-85
- [133] Neddersen, J.; Chumanov, G. und Cotton, T.M. (1993): Laser Ablation of Metals: A New Method for Preparing SERS Active Colloids, *Appl. Spectrosc.* **47**, 12, Seite 1959-1964
- [134] Eustis, S.; Hsu, H.-Y. und El-Sayed, M.A. (2005): Gold Nanoparticle Formation from Photochemical Reduction of Au<sup>3+</sup> by Continuous Excitation in Colloidal Solutions. A Proposed Molecular Mechanism, *J. Phys. Chem. B* **109**, 11, Seite 4811-4815
- [135] Sakai, T. und Alexandridis, P. (2005): Spontaneous Formation of Gold Nanoparticles in Poly(ethylene oxide)Poly(propylene oxide) Solutions: Solvent Quality and Polymer Structure Effects, *Langmuir* **21**, 17, Seite 8019-8025
- [136] Cao, G. (2004): *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications*, Imperial College Press, London, ISBN: 1-86094-415-9
- [137] Sylvestre, J.-P.; Poulin, S.; Kabashin, A.V.; Sacher, E.; Meunier, M. und Luong, J.H. T. (2004): Surface Chemistry of Gold Nanoparticles Produced by Laser Ablation in Aqueous Media, *J. Phys. Chem. B* **108**, 43, Seite 16864-16869
- [138] Pflieger, J.; Smejkal, P.; Vlckova, B. und Slouf, M. (2003): Preparation of Ag nanoparticles by two-wavelength laser ablation and fragmentation, *Advanced Organic and Inorganic Optical Materials*
- [139] Shirtcliffe, Neil; Nickel, Ulrich und Schneider, Siegfried (1999): Reproducible Preparation of Silver Sols with Small Particle Size Using Borohydride Reduction: For Use as Nuclei for Preparation of Larger Particles, *J. Coll. Int. Sci.* **211**, 1, Seite 122-129
- [140] Kelly, K.L.; Coronado, E.; Zhao, L.L. und Schatz, G.C. (2002): The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment, *J. Phys. Chem. B* **107**, 3, Seite 668-677



- 
- [141] Orendorff, C.J.; Gearheart, L.; Jana, N.R. und Murphy, C.J. (2006): Aspect ratio dependence on surface enhanced Raman scattering using silver and gold nanorod substrates, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8**, *1*, Seite 165-170
- [142] Emory, S.R.; Haskins, W.E. und Nie, S. (1998): Direct Observation of Size-Dependent Optical Enhancement in Single Metal Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, *31*, Seite 8009-8010
- [143] Zhang, J.; Li, X.; Sun, X. und Li, Y. (2005): Surface Enhanced Raman Scattering Effects of Silver Colloids with Different Shapes, *J. Phys. Chem. B* **109**, *25*, Seite 12544-12548
- [144] Kneipp, J.; Li, X.; Sherwood, M.; Panne, U.; Kneipp, H.; Stockman, M.I. und Kneipp, K. (2008): Gold Nanolenses Generated by Laser Ablation-Efficient Enhancing Structure for Surface Enhanced Raman Scattering Analytics and Sensing, *Anal. Chem.* **80**, *11*, Seite 4247-4251
- [145] Li, K.; Li, X.; Stockman, M.I. und Bergman, D.J. (2005): Surface plasmon amplification by stimulated emission in nanolenses, *Phys. Rev. B* **71**, *11*, Seite 115409 (5 pages)
- [146] Liang, E. J.; Ye, X. L. und Kiefer, W. (1997): Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Crystal Violet in the Presence of Halide and Halate Ions with Near-Infrared Wavelength Excitation, *J. Phys. Chem. A* **101**, *40*, Seite 7330-7335
- [147] Cañamares, M.V.; Chenal, C.; Birke, R.L. und Lombardi, J.R. (2008): DFT, SERS, and Single-Molecule SERS of Crystal Violet, *J Phys. Chem. C* **112**, *51*, Seite 20295-20300
- [148] Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Itzkan, I.; Dasari, R.R. und Feld, M.S. (1996): Population Pumping of Excited Vibrational States by Spontaneous Surface-Enhanced Raman Scattering, *Phys. Rev. Lett.* **76**, *14*, Seite 2444-2447
- [149] Giese, B. und McNaughton, D. (2002): Surface-enhanced Raman spectroscopic and density functional theory study of adenine adsorption to silver surfaces, *J. Phys. Chem. B* **106**, *1*, Seite 101-112
- [150] Otto, C.; Demul, F. F. M.; Huizinga, A. und Greve, J. (1988): Surface Enhanced Raman-Scattering of Derivatives of Adenine - the Importance of the External Amino Group in Adenine for Surface Binding, *J. Phys. Chem.* **92**, *5*, Seite 1239-1244
- [151] Liang, E. J.; Engert, C. und Kiefer, W. (1993): Surface-enhanced Raman scattering of pyridine in silver colloids excited in the near-infrared region, *J. Raman Spec.* **24**, *11*, Seite 775-779

- [152] Cañamares, M. V.; Garcia-Ramos, J. V.; Sanchez-Cortes, S.; Castillejo, M. und Oujja, M. (2008): Comparative SERS effectiveness of silver nanoparticles prepared by different methods: A study of the enhancement factor and the interfacial properties, *J. Coll. Interf. Sci.* **326**, 1, Seite 103-109
- [153] Jiali, N.; Zhu, T. und Liu, Z. (2007): One-step seed-mediated growth of 30-150 nm quasispherical gold nanoparticles with 2-mercaptosuccinic acid as a new reducing agent, *Nanotech.* **18**, 32, Seite 325607 (7 pages)
- [154] Brown, K.R.; Walter, D.G. und Natan, M.J. (2000): Seeding of Colloidal Au Nanoparticle Solutions. 2. Improved Control of Particle Size and Shape, *Chem. Mater.* **12**, 2, Seite 306-313
- [155] Sau, T.K.; Pal, A.; Jana, N.R.; Wang, Z.L. und Pal, T. (2001): Size Controlled Synthesis of Gold Nanoparticles using Photochemically Prepared Seed Particles, *J. Nanopart. Res.* **3**, 4, Seite 257-261
- [156] Yang, W.-H.; Schatz, G.C. und Van Duyne, R. (1995): Discrete dipole approximation for calculating extinction and Raman intensities for small particles with arbitrary shapes, *J. Chem. Phys.* **103**, 3, Seite 869-875
- [157] Wei, A.; Kim, B.; Sadtler, B. und Tripp, S.L. (2001): Tunable Surface-Enhanced Raman Scattering from Large Gold Nanoparticle Arrays, *Chem. Phys. Chem.* **2**, 12, Seite 743-745
- [158] Zhu, Z.; Zhu, T. und Liu, Z. (2004): Raman scattering enhancement contributed from individual gold nanoparticles and interparticle coupling, *Nanotech.* **15**, 3, Seite 357-364
- [159] Haynes, C.L.; McFarland, A.D.; Zhao, L.; Van Duyne, R.P.; Schatz, G.C.; Gunnarsson, L.; Prikulis, J.; Kasemo, B. und Käll, M. (2003): Nanoparticle Optics: The Importance of Radiative Dipole Coupling in Two-Dimensional Nanoparticle Arrays *J. Phys. Chem. B* **107**, 30, Seite 7337-7342
- [160] Nordlander, P.; Oubre, C.; Prodan, E.; Li, K. und Stockman, M. I. (2004): Plasmon Hybridization in Nanoparticle Dimers, *Nano Lett.* **4**, 5, Seite 899-903
- [161] McMahon, J.; Henry, A.-I.; Wustholz, K.; Natan, M.; Freeman, R.; Van Duyne, R. und Schatz, G. (2009): Gold nanoparticle dimer plasmonics: finite element method calculations of the electromagnetic enhancement to surface-enhanced Raman spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 7, Seite 1819-1825
- [162] Gunnarsson, L.; Bjerneld, E. J.; Xu, H.; Petronis, S.; Kasemo, B. und Käll, M. (2001): Interparticle coupling effects in nanofabricated substrates for surface-enhanced Raman scattering, *Appl. Phys. Lett.* **78**, 6, Seite 802-804

- 
- [163] Hill, W. und Wehling, B. (1993): Potential- and pH-dependent surface-enhanced Raman scattering of p-mercapto aniline on silver and gold substrates, *J. Phys. Chem.* **97**, 37, Seite 9451-9455
- [164] Osawa, M.; Matsuda, N.; Yoshii, K. und Uchida, I. (1994): Charge transfer resonance Raman process in surface-enhanced Raman scattering from p-aminothiophenol adsorbed on silver: Herzberg-Teller contribution, *J. Phys. Chem.* **98**, 48, Seite 12702-12707
- [165] Driskell, J.D.; Lipert, R.J. und Porter, M.D. (2006): Labeled Gold Nanoparticles Immobilized at Smooth Metallic Substrates: Systematic Investigation of Surface Plasmon Resonance and Surface-Enhanced Raman Scattering, *J. Phys. Chem. B* **110**, 35, Seite 17444-17451
- [166] Jacak, W.; Krasnyj, J.; Jacak, J.; Gonczarek, R.; Chepok, A.; Jacak, L.; Hu, D. Z. und Schaadt, D. (2010): Radius dependent shift in surface plasmon frequency in large metallic nanospheres: Theory and experiment, *J. Appl. Phys.* **107**, 12, Seite 124317 (13 pages)
- [167] Shibamoto, K.; Katayama, K. und Sawada, T. (2007): Ultrafast charge transfer in surface-enhanced Raman scattering (SERS) processes using transient reflecting grating (TRG) spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.* **433**, 4-6, Seite 385-389
- [168] Kreibig, U. und Fragstein, C. v (1969): The limitation of electron mean free path in small silver particles, *Z. Physik* **224**, 4, Seite 307-323
- [169] Shah, N.C.; Lyandres, O.; Walsh, J.T.; Glucksberg, M.R. und Van Duyne, R.P. (2007): Lactate and Sequential Lactate-Glucose Sensing Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.* **79**, 18, Seite 6927-6932
- [170] Driskell, J.D.; Primera-Pedrozo, O.M.; Dluhy, R.A.; Zhao, Y. und Tripp, R.A. (2009): Quantitative Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Based Analysis of MicroRNA Mixtures, *Appl. Spec.* **63**, 10, Seite 1107-1114
- [171] Peron, O.; Rinnert, E.; Toury, T.; Lamy de la Chapelle, M. und Compere, C. (2011): Quantitative SERS sensors for environmental analysis of naphthalene, *Analyst* **136**, 5, Seite 1018-1022
- [172] Zhang, X.; Young, M.A.; Lyandres, O. und Van Duyne, R.P. (2005): Rapid Detection of an Anthrax Biomarker by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12, Seite 4484-4489
- [173] Tao, Y.-T.; Wu, C.-C.; Eu, J.-Y.; Lin, W.-L.; Wu, K.-C. und Chen, C.-H. (1997): Structure Evolution of Aromatic-Derivatized Thiol Monolayers on Evaporated Gold, *Langmuir* **13**, 15, Seite 4018-4023

- [174] Tour, J. M.; Jones, L.; Pearson, D. L.; Lamba, J. J. S.; Burgin, T. P.; Whitesides, G. M.; Allara, D. L.; Parikh, A. N. und Atre, S. V. (1995): Self-Assembled Monolayers and Multilayers of Conjugated Thiols, Alpha,Omega-Dithiols, and Thioacetyl-Containing Adasorbates - Understanding Attachments Between Potential Molecular Wires and Gold Surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 37, Seite 9529-9534
- [175] Michota, A.; Kudelski, A. und Bukowska, J. (2002): Molecular structure of cysteamine monolayers on silver and gold substrates: Comparative studies by surface-enhanced Raman scattering, *Surf. Sci.* **502-503**, Seite 214-218
- [176] Huang, C.; Bonroy, K.; Reekmans, G.; Laureyn, W.; Verhaegen, K.; De Vlaminck, I.; Lagae, L. und Borghs, G. (2009): Localized surface plasmon resonance biosensor integrated with microfluidic chip, *Biomed. Microdev.* **11**, 4, Seite 893-901
- [177] Hu, M.; Noda, S.; Okubo, T.; Yamaguchi, Y. und Komiyama, H. (2001): Structure and morphology of self-assembled 3-mercaptopropyltrimethoxysilane layers on silicon oxide, *Appl. Surf. Sci.* **181**, 3-4, Seite 307-316
- [178] Kotryl, S. und Sucha, L. (1985): *Handbook of Chemical Equilibria in Analytical Chemistry*, Ellis Horwood Ltd, Chichester
- [179] Ibrahim, Amin; Oldham, Philip B.; Stokes, David L.; Vo-Dinh, Tuan und Loo, Boon H. (2005): A comparison of enhancement factors for surface-enhanced Raman scattering using visible and near-infrared excitations, *J. Mol. Struct.* **735-736**, Seite 69-73
- [180] Mu, C.; Zhang, J.-P. und Xu, D. (2009): Au nanoparticle arrays with tunable particle gaps by template-assisted electroless deposition for high performance surface-enhanced Raman scattering, *Nanotech.* **21**, 1, Seite 015604 (6 pages)
- [181] Yan, B.; Thubagere, A.; Premasiri, W.R.; Ziegler, L.D.; Dal Negro, L. und Reinhard, B.M. (2009): Engineered SERS Substrates with Multiscale Signal Enhancement: Nanoparticle Cluster Arrays, *ACS Nano* **3**, 5, Seite 1190-1202
- [182] Fazio, E.; Neri, F.; D'Andrea, C.; Ossi, P. M.; Santo, N. und Trusso, S. (2011): SERS activity of pulsed laser ablated silver thin films with controlled nanostructure, *J. Raman Spec.* **42**, 6, Seite 1298-1304
- [183] Grosserueschkamp, M.; Nowak, C.; Schach, D.; Schaertl, W.; Knoll, W. und Naumann, R.L.C. (2009): Silver Surfaces with Optimized Surface Enhancement by Self-Assembly of Silver Nanoparticles for Spectroelectrochemical Applications, *J. Phys. Chem. C* **113**, 41, Seite 17698-17704
- [184] Papavassiliou, G.C. (1976): Surface plasmons in small Au-Ag alloy particles, *J. Phys. F* **6**, 4, Seite L103-L105

- 
- [185] Kester, J. J. und Furtak, T. E. (1982): The role of electron scattering in the surface enhanced Raman effect on Ag-Au alloys, *Sol. State Commun.* **41**, 6, Seite 457-460
- [186] Walczak, M.M.; Chung, C.; Stole, S.M.; Widrig, C.A. und Porter, M.D. (1991): Structure and interfacial properties of spontaneously adsorbed n-alkanethiolate monolayers on evaporated silver surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 7, Seite 2370-2378
- [187] Rivas, L.; Sanchez-Cortes, S.; García-Ramos, J. V. und Morcillo, G. (2000): Mixed Silver/Gold Colloids: A Study of Their Formation, Morphology, and Surface-Enhanced Raman Activity, *Langmuir* **16**, 25, Seite 9722-9728
- [188] Liz-Marzan, L.M. (2006): Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles, *Langmuir* **22**, 1, Seite 32-41
- [189] Jana, N.R. (2003): Silver coated gold nanoparticles as new surface enhanced Raman substrate at low analyte concentration, *Analyst* **128**, 7, Seite 954-956
- [190] Wang, Y.; Chen, H.; Dong, S. und Wang, E. (2006): Surface enhanced Raman scattering of p-aminothiophenol self-assembled monolayers in sandwich structure fabricated on glass, *J. Chem. Phys.* **124**, 7, Seite 074709 (8 pages)
- [191] Joseph, V.; Matschulat, A.; Polte, J.; Rolf, S.; Emmerling, F. und Kneipp, J. (2011): SERS enhancement of gold nanospheres of defined size, *J. Raman Spec.* **42**, 9, Seite 1736-1742
- [192] Chen, H.; Ming, T.; Zhang, S.; Jin, Z.; Yang, B. und Wang, J. (2011): Effect of the Dielectric Properties of Substrates on the Scattering Patterns of Gold Nanorods, *ACS Nano* **5**, 6, Seite 4865-4877
- [193] Nordlander, P. und Prodan, E. (2004): Plasmon Hybridization in Nanoparticles near Metallic Surfaces, *Nano Lett.* **4**, 11, Seite 2209-2213
- [194] Arenz, M.; Mayrhofer, K.J.J.; Stamenkovic, V.; Bliznac, B.B.; Tomoyuki, T.; Ross, P.N. und Markovic, N.M. (2005): The Effect of the Particle Size on the Kinetics of CO Electrooxidation on High Surface Area Pt Catalysts, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 18, Seite 6819-6829
- [195] Cremer, Paul; Stanners, Colin; Niemantsverdriet, J. W.; Shen, Y. R. und Somorjai, Gabor (1995): The conversion of di- $\sigma$  bonded ethylene to ethylidyne on Pt(111) monitored with sum frequency generation: evidence for an ethylidene (or ethyl) intermediate, *Surf. Sci.* **328**, 1-2, Seite 111-118
- [196] Lehwald, S.; Ibach, H. und Demuth, J. E. (1978): Vibration spectroscopy of benzene adsorbed on Pt(111) and Ni(111), *Surf. Sci.* **78**, 3, Seite 577-590

- [197] Kim, J. und Gewirth, A.A. (2006): Mechanism of Oxygen Electroreduction on Gold Surfaces in Basic Media, *J. Phys. Chem. B* **110**, 6, Seite 2565-2571
- [198] Tian, Z.-Q. und Ren, B. (2004): Adsorption and Reaction at Electrochemical Interfaces as Probed by Surface Enhanced Raman Spectroscopy, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **55**, 1, Seite 197-229
- [199] Taylor, R.J.; Jiang, Y.X.; Rees, N.V.; Attard, G.A.; Jeffery, E.L. und Willock, D.J. (2011): Enantioselective Hydrogenation of alpha-Ketoesters: An in Situ Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) Study, *J. Phys. Chem. C* **115**, 43, Seite 21363-21372
- [200] Gao, P.; Gosztola, D. und Weaver, M.J. (1988): Surface-enhanced raman spectroscopy as a probe of electroorganic reaction pathways. 1. Processes involving adsorbed nitrobenzene, azobenzene, and related species, *J. Phys. Chem.* **92**, 25, Seite 7122-7130
- [201] Zhang, Y. und Weaver, M.J. (1993): Application of surface-enhanced Raman spectroscopy to organic electrocatalytic systems: decomposition and electrooxidation of methanol and formic acid on gold and platinum-film electrodes, *Langmuir* **9**, 5, Seite 1397-1403
- [202] Wackerbarth, H.; Klar, U.; Gunther, W. und Hildebrandt, P. (1999): Novel Time-Resolved Surface-Enhanced (Resonance) Raman Spectroscopic Technique for Studying the Dynamics of Interfacial Processes: Application to the Electron Transfer Reaction of Cytochrome c at a Silver Electrode, *Appl. Spec.* **53**, 3, Seite 283-291
- [203] Saha, S.; Pal, A.; Kundu, S.; Basu, S. und Pal, T. (2010): Photochemical Green Synthesis of Calcium-Alginate-Stabilized Ag and Au Nanoparticles and Their Catalytic Application to 4-Nitrophenol Reduction, *Langmuir* **26**, 4, Seite 2885-2893
- [204] Wunder, S.; Polzer, F.; Lu, Y.; Mei, Y. und Ballauff, M. (2010): Kinetic Analysis of Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol by Metallic Nanoparticles Immobilized in Spherical Polyelectrolyte Brushes, *J. Phys. Chem. C* **114**, 19, Seite 8814-8820
- [205] Mei, Y.; Sharma, G.; Lu, Y.; Ballauff, M.; Drechsler, M.; Irrgang, T. und Kempe, R. (2005): High Catalytic Activity of Platinum Nanoparticles Immobilized on Spherical Polyelectrolyte Brushes, *Langmuir* **21**, 26, Seite 12229-12234
- [206] Gu, X. J.; Akers, K. L. und Moskovits, M. (1992): A study of the reaction of ethylene oxide on coldly deposited silver surfaces by SERS and EELS, *J. Phys. Chem.* **96**, 1, Seite 383-387

- 
- [207] Flynn, N.T. und Gewirth, A.A. (2002): Attenuation of surface-enhanced Raman spectroscopy response in gold–platinum core-shell nanoparticles, *J. Raman Spec.* **33**, 4, Seite 243-251
- [208] Lu, L.; Sun, G.; Zhang, H.; Wang, H.; Xi, S.; Hu, J.; Tian, Z. und Chen, R. (2004): Fabrication of core-shell Au-Pt nanoparticle film and its potential application as catalysis and SERS substrate, *J. Mater. Chem.* **14**, 6, Seite 1005-1009
- [209] Xie, W.; Herrmann, C.; Koempe, K.; Haase, M. und Schluecker, S. (2011): Synthesis of Bifunctional Au/Pt/Au Core/Shell Nanoraspberries for in Situ SERS Monitoring of Platinum-Catalyzed Reactions, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 48, Seite 19302-19305
- [210] Heck, K.N.; Janesko, B.G.; Scuseria, G.E.; Halas, N.J. und Wong, M.S. (2008): Observing Metal-Catalyzed Chemical Reactions in Situ Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy on Pd-Au Nanoshells, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 49, Seite 16592-16600
- [211] Liu, H. und Yang, Q. (2011): Facile fabrication of nanoporous Au-Pd bimetallic foams with high catalytic activity for 2-nitrophenol reduction and SERS property, *J. Mater. Chem.* **21**, 32, Seite 11961-11967
- [212] Fang, P.-P.; Li, J.-F.; Yang, Z.-L.; Li, L.-M.; Ren, B. und Tian, Z.-Q. (2008): Optimization of SERS activities of gold nanoparticles and gold-core-palladium-shell nanoparticles by controlling size and shell thickness, *J. Raman Spec.* **39**, 11, Seite 1679-1687
- [213] Sau, T.K.; Pal, A. und Pal, T. (2001): Size Regime Dependent Catalysis by Gold Nanoparticles for the Reduction of Eosin, *J. Phys. Chem. B* **105**, 38, Seite 9266-9272
- [214] Xu, Run; Wang, Dingsheng; Zhang, Jiatao und Li, Yadong (2006): Shape-Dependent Catalytic Activity of Silver Nanoparticles for the Oxidation of Styrene, *Chem. Asian J.* **1**, 6, Seite 888-893
- [215] Skadtchenko, B. O. und Aroca, R. (2001): Surface-enhanced Raman scattering of p-nitrothiophenol: Molecular vibrations of its silver salt and the surface complex formed on silver islands and colloids, *Spectrochim. Acta A* **57**, 5, Seite 1009-1016
- [216] Stosch, R.; Henrion, A.; Schiel, D. und Güttler, B. (2005): Surface-Enhanced Raman Scattering Based Approach for Quantitative Determination of Creatinine in Human Serum, *Anal. Chem.* **77**, 22, Seite 7386-7392
- [217] Ackermann, K.R.; Henkel, T. und Popp, J. (2007): Quantitative Online Detection of Low-Concentrated Drugs via a SERS Microfluidic System, *ChemPhysChem* **8**, 18, Seite 2665-2670

- [218] Otto, A. (1991): Surface-enhanced Raman scattering of adsorbates, *J. Raman Spectrosc.* **22**, 12, Seite 743-752
- [219] Alvarez-Puebla, R. A.; Dos Santos, D. S. und Aroca, R. F. (2004): Surface-enhanced Raman scattering for ultrasensitive chemical analysis of 1 and 2-naphthalenethiols, *Analyst* **129**, 12, Seite 1251-1256
- [220] Huang, Y.-F.; Zhu, H.-P.; Liu, G.-K.; Wu, D.-Y.; Ren, B. und Tian, Z.-Q. (2010): When the Signal Is Not from the Original Molecule To Be Detected: Chemical Transformation of para-Aminothiophenol on Ag during the SERS Measurement, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 27, Seite 9244-9246
- [221] Dong, B.; Fang, Y.; Chen, X.; Xu, H. und Sun, M. (2011): Substrate-, Wavelength- and Time-Dependent Plasmon-Assisted Surface Catalysis Reaction of 4-Nitrobenzenethiol Dimerizing to p,p'-Dimercaptoazobenzene on Au, Ag, and Cu Films, *Langmuir* **27**, 17, Seite 10677-10682
- [222] Dong, B.; Fang, Y.; Xia, L.; Xu, H. und Sun, M. (2011): Is 4-nitrobenzenethiol converted to p,p'-dimercaptoazobenzene or 4-aminothiophenol by surface photochemistry reaction?, *J. Raman Spec.* **42**, 6, Seite 1205-1206
- [223] Matsuda, N.; Sawaguchi, T.; Osawa, M. und Uchida, I. (1995): Surface-Assisted Photoinduced Reduction of p-Nitrothiophenol Self-Assembled Monolayer Adsorbed on a Smooth Silver Electrode, *Chemistry Lett.* **24**, 2, Seite 145-146
- [224] Matsuda, N.; Yoshii, K.; Ataka, K.; Osawa, M.; Matsue, T. und Uchida, I. (1992): Surface-Enhanced Infrared and Raman Studies of Electrochemical Reduction of Self-Assembled Monolayers Formed from para-Nitrothiophenol at Silver, *Chemistry Lett.* **21**, 7, Seite 1385-1388
- [225] Mahmoud, M. A.; Snyder, B. und El-Sayed, M. A. (2009): Polystyrene Microspheres: Inactive Supporting Material for Recycling and Recovering Colloidal Nanocatalysts in Solution, *J. Phys. Chem. Lett.* **1**, 1, Seite 28-31
- [226] Mei, Y.; Lu, Y.; Polzer, F.; Ballauff, M. und Drechsler, M. (2007): Catalytic activity of palladium nanoparticles encapsulated in spherical polyelectrolyte brushes and core-shell microgels, *Chem. Mater.* **19**, 5, Seite 1062-1069
- [227] Hanaya, K.; Muramatsu, T.; Kudo, H. und Chow, Y.L. (1979): Reduction of aromatic nitro-compounds to amines with sodium borohydride-copper(II) acetylacetonate, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, Seite 2409-2410
- [228] Metin, Ö. und Özkar, S. (2007): Hydrogen generation from the hydrolysis of sodium borohydride by using water dispersible, hydrogenphosphate-stabilized nickel(0) nanoclusters as catalyst, *Int. J. Hydrogen Energy* **32**, 12, Seite 1707-1715



- 
- [229] Zhou, X.; Xu, W.; Liu, G.; Panda, D. und Chen, P. (2010): Size-Dependent Catalytic Activity and Dynamics of Gold Nanoparticles at the Single-Molecule Level, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, *1*, Seite 138-146
- [230] Sengupta, A.; Brar, N. und Davis, E. J. (2007): Bioaerosol detection and characterization by surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Coll. Int. Sci.* **309**, *1*, Seite 36-43
- [231] Laucks, M. L.; Roll, G.; Schweiger, G. und Davis, E. J. (2000): Physical and chemical (Raman) characterization of bioaerosols - Pollen, *J. Aerosol Sci.* **31**, *3*, Seite 307-319
- [232] Fergenson, D. P.; Pitesky, M. E.; Tobias, H. J.; Steele, P. T.; Czerwieniec, G. A.; Russell, S. C.; Lebrilla, C. B.; Horn, J. M.; Coffee, K. R.; Srivastava, A.; Pillai, S. P.; Shih, M. T. P.; Hall, H. L.; Ramponi, A. J.; Chang, J. T.; Langlois, R. G.; Estacio, P. L.; Hadley, R. T.; Frank, M. und Gard, E. E. (2004): Reagentless detection and classification of individual bioaerosol particles in seconds, *Anal. Chem.* **76**, *2*, Seite 373-378
- [233] Schulte, F.; Lingott, J.; Panne, U. und Kneipp, J. (2008): Chemical Characterization and Classification of Pollen, *Anal. Chem.* **80**, *24*, Seite 9551-9556
- [234] Ivleva, N.; Niessner, R. und Panne, U. (2005): Characterization and discrimination of pollen by Raman microscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* **381**, *1*, Seite 261-267
- [235] Zimmermann, B. (2010): Characterization of Pollen by Vibrational Spectroscopy, *Appl. Spec.* **64**, *12*, Seite 1364-1373
- [236] Dell'Anna, R.; Lazzeri, P.; Frisanco, M.; Monti, F.; Malvezzi Campeggi, F.; Gottardini, E. und Bersani, M. (2009): Pollen discrimination and classification by Fourier transform infrared (FT-IR) microspectroscopy and machine learning, *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, *5*, Seite 1443-1452
- [237] Schulte, F.; Joseph, V.; Panne, U. und Kneipp, J. (2010): Applications of Raman and surface-enhanced Raman scattering to the analysis of eukaryotic samples, Matousek, P. und Morris, M. D., *Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields*, 1st Edition. Auflage, Heidelberg, Berlin
- [238] Sengupta, A.; Laucks, M. L. und Davis, E. J. (2005): Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacteria and pollen, *Appl. Spec.* **59**, *8*, Seite 1016-1023
- [239] Joseph, V.; Schulte, F.; Roach, H.; Feldmann, I.; Doerfel, I.; Oesterle, W.; Panne, U. und Kneipp, J. (2011): Surface-enhanced Raman scattering with silver nanostructures generated in situ in a sporopollenin biopolymer matrix, *Chem. Commun.* **47**, *11*, Seite 3236-3238

- [240] Joseph, V. (2008): Herstellung und Charakterisierung neuer SERS-Substrate für bioanalytische Anwendungen, Diplomarbeit
- [241] Kneipp, K.; Wang, Y.; Dasari, R.R. und Feld, M.S. (1995): Approach to Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Study Using Rhodamine 6G on Colloidal Silver, *Appl. Spec.* **49**, 6, Seite 780-784
- [242] Giese, B. und McNaughton, D. (2002): Surface-enhanced Raman spectroscopic study of uracil. The influence of the surface substrate, surface potential, and pH, *J. Phys. Chem. B* **106**, 6, Seite 1461-1470
- [243] Chen, L.; Han, X.; Yang, J.; Zhou, J.; Song, W.; Zhao, B.; Xu, W. und Ozaki, Y. (2011): Detection of proteins on Silica-Silver Core-Shell substrates by surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Coll. Interf. Sci.* **360**, 2, Seite 482-487
- [244] Naumann, D.; Helm, D. und Labischinski, H. (1991): Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy, *Nature* **351**, 6321, Seite 81-82
- [245] Ward, Joe H., Jr. (1963): Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function, *J. Am. Stat. Assoc.* **58**, 301, Seite 236-244
- [246] Sokolov, K.; Khodorchenko, P.; Petukhov, A.; Nabiev, I.; Chumanov, G. und Cotton, T. M. (1993): Contributions of Short-Range and Classical Electromagnetic Mechanisms to Surface-Enhanced Raman-Scattering from Several Types of Biomolecules Adsorbed on Cold-Deposited Island Films, *Appl. Spec.* **47**, 4, Seite 515-522
- [247] Stewart, S. und Fredericks, P. M. (1999): Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface, *Spectrochim. Acta A* **55**, 7-8, Seite 1641-1660
- [248] Reinikainen, K. J.; Soininen, H. und Riekkinen, P. J. (1990): Neurotransmitter changes in alzheimer's disease: Implications to diagnostics and therapy, *J. Neurosci. Res.* **27**, 4, Seite 576-586
- [249] Barkhatova, V.; Zavalishin, I.; Askarova, L.; Shavratskii, V. und Demina, E. (1998): Changes in neurotransmitters in multiple sclerosis, *Neurosci. Behav. Physiol.* **28**, 4, Seite 341-344
- [250] Tsunoda, M. (2006): Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 3, Seite 506-514
- [251] Kneipp, K.; Wang, Y.; Dasari, R.R. und Feld, M.S. (1995): Near-infrared surface-enhanced Raman scattering (NIR-SERS) of neurotransmitters in colloidal silver solutions, *Spectrochim. Acta A* **51**, 3, Seite 481-487

- 
- [252] McGlashen, M.L.; Davis, K.L. und Morris, M.D. (1990): Surface-enhanced Raman scattering of dopamine at polymer-coated silver electrodes, *Anal. Chem.* **62**, 8, Seite 846-849
- [253] Volkan, M.; Stokes, D. L. und Vo-Dinh, T. (2000): Surface-Enhanced Raman of Dopamine and Neurotransmitters Using Sol-Gel Substrates and Polymer-Coated Fiber-Optic Probes *Appl. Spec.* **54**, 12, Seite 1842-1848
- [254] Xu, H. X.; Bjerneld, E. J.; Käll, M. und Borjesson, L. (1999): Spectroscopy of single hemoglobin molecules by surface enhanced Raman scattering, *Phys. Rev. Lett.* **83**, 21, Seite 4357-4360
- [255] Weiss, A. und Haran, G. (2001): Time-dependent single-molecule Raman scattering as a probe of surface dynamics, *J. Phys. Chem. B* **105**, 49, Seite 12348-12354
- [256] Lee, N.S.; Hsieh, Y.Z.; Paisley, R.F. und Morris, M.D. (1988): Surface-enhanced Raman spectroscopy of the catecholamine neurotransmitters and related compounds, *Anal. Chem.* **60**, 5, Seite 442-446
- [257] Kennedy, B. J.; Spaeth, S.; Dickey, M. und Carron, K. T. (1999): Determination of the Distance Dependence and Experimental Effects for Modified SERS Substrates Based on Self-Assembled Monolayers Formed Using Alkanethiols, *J. Phys. Chem. B* **103**, 18, Seite 3640-3646
- [258] Lennard, L.; Van Loon, J.A. und Weinshilboum, R.M. (1989): Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: Relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism, *Clin. Pharm. Ther.* **46**, 2, Seite 149-154
- [259] Kröplin, T.; Weyer, N.; Gutsche, S. und Iven, H. (1998): Thiopurine S-methyltransferase activity in human erythrocytes: a new HPLC method using 6-thioguanine as substrate, *Eur. J. Clin. Pharm.* **54**, 3, Seite 265-271
- [260] Lennard, L. und Singleton, H.J. (1994): High-performance liquid chromatographic assay of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity, *J. Chromatography B* **661**, 1, Seite 25-33
- [261] Ford, L.T und Berg, J.D (2010): Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) assessment prior to starting thiopurine drug treatment; a pharmacogenomic test whose time has come, *J. Clin. Pathol.* **63**, 4, Seite 288-295
- [262] März, A.; Mönch, B.; Rösch, P.; Kiehntopf, M.; Henkel, T. und Popp, J. (2011): Detection of thiopurine methyltransferase activity in lysed red blood cells by means of lab-on-a-chip surface enhanced Raman spectroscopy (LOC-SERS), *Anal. Bioanal. Chem.* **400**, 9, Seite 2755-2761

- [263] Vivoni, A.; Chen, S.-P.; Ejeh, D. und Hosten, C.M. (2000): Determination of the Orientation of 6-Mercaptopurine Adsorbed on a Silver Electrode by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Normal Mode Calculations, *Langmuir* **16**, 7, Seite 3310-3316
- [264] Tiller, F.-W. und Stein, B. (2005): Das klinische Labor, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage. Auflage, ecomed Medizin
- [265] Cataldi, T.R.I.; Bianco, G.; Abate, S. und Mattia, D. (2009): Analysis of S-adenosylmethionine and related sulfur metabolites in bacterial isolates of *Pseudomonas aeruginosa* (BAA-47) by liquid chromatography/electrospray ionization coupled to a hybrid linear quadrupole ion trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 21, Seite 3465-3477
- [266] Stosch, R.; Yaghobian, F.; Weimann, T.; Brown, R. J. C.; Milton, M. J. T. und Guttler, B. (2011): Lithographical gap-size engineered nanoarrays for surface-enhanced Raman probing of biomarkers, *Nanotech.* **22**, 10, Seite 105303 (6 pages)
- [267] Brown, K.R.; Lyon, L.A.; Fox, A.P.; Reiss, B.D. und Natan, M.J. (2000): Hydroxylamine Seeding of Colloidal Au Nanoparticles. 3. Controlled Formation of Conductive Au Films, *Chem. Mater.* **12**, 2, Seite 314-323
- [268] Sellers, H.; Ulman, A.; Shnidman, Y. und Eilers, J. E. (1993): Structure and Binding of Alkanethiolates on Gold and Silver Surfaces - Implications for Self Assembled Monolayers, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 21, Seite 9389-9401

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Vereinfachte schematische Darstellung der Immobilisierung von Nanopartikeln auf einer Glasoberfläche mittels eines Organosilans. ....	13
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Prozesse bei der Rayleigh-, Raman- und Resonanz-Raman-Streuung. $E_0$ und $E_1$ entsprechen dem elektronischen Grundzustand bzw. ersten angeregtem elektronischen Zustand im Molekül und $V$ ist die Schwingungsquantenzahl. ....	17
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Energiezustände in einem Molekül-Metall-System mit einem erlaubten Übergang zwischen dem Molekülgrundzustand und dem angeregten Molekülzustand. Die Abbildung zeigt einen Elektronentransfer vom Molekül zum Metall. ....	22
Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Spitzenverbreiterung, die in SFM-Messungen auftreten kann, wenn ein Partikel mit Radius $r_p$ mit einer Spitze mit Radius $r_s$ untersucht wird. ....	27
Abbildung 2-4: Schematische Skizze der Streuung eines Röntgenstrahls an einem punktförmigen Streuzentrum innerhalb eines Partikels. ....	28
Abbildung 2-5: Beispielhafte Auftragung der Streuintensität in Abhängigkeit des Streuvektors $q$ einer Goldnanopartikellösung und entsprechender Fit zur Bestimmung der Größe und Polydispersität der Nanopartikel. ....	29
Abbildung 2-6: Schematische Darstellung einer Yee-Zelle. Die elektrischen Feldkomponenten sind auf den Kanten der Zelle angeordnet und die magnetischen Feldkomponenten auf den Flächen. ....	33
Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte bei der Herstellung von nanostrukturierten Oberflächen mit Elektronenstrahlolithographie (EBL). ....	38
Abbildung 3-2: Schematischer Aufbau des verwendeten Raman-Mikroskops bestehend aus: Laser, Spiegeln (S), Neutralsichtfilter (NDF), Mikroskopobjektiv (MO), positionierbarer Probentisch mit Probe, Notch-Filter/Kantenfilter (NF/KF), Spektrometer und CCD-Detektor. ....	41

Abbildung 3-3: Schematische Darstellung eines Zylinderdimers mit Durchmesser $d$ und Abstand $a$ und zugehörigem Koordinatensystem in den FDTD-Simulationen. ....	44
Abbildung 4-1: Extinktionsspektren der unterschiedlichen a) Gold- und b) Silbernanopartikel in Lösung. ....	50
Abbildung 4-2: TEM-Aufnahmen von a) Citrat-reduzierten Silbernanopartikeln (AgNP1), b) Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln (AgNP2), c) laserablatierten Silbernanopartikeln (AgNP4) und d) Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln (AuNP1), e) Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln (AuNP3) und die daraus ermittelten Größenverteilungen (A-E, gleiche Reihenfolge). ....	52
Abbildung 4-3: SERS-Spektren von a) $5 \cdot 10^{-7}$ M Adenin und 8,2 M Methanol und b) $5 \cdot 10^{-7}$ M CV auf Citrat-reduzierten Goldnanoaggregaten (a) $\lambda = 785$ nm, $I = 8 \cdot 10^4$ W·cm <sup>-2</sup> , 1 s und b) $\lambda = 633$ nm, $I = 2,7 \cdot 10^4$ W·cm <sup>-2</sup> , 1 s). ....	54
Abbildung 4-4: Strukturformeln von Adenin, Kristallviolett und <i>p</i> -Aminothiophenol .....	57
Abbildung 4-5: Extinktionsspektren von monodispersen, Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln mit einem Radius von 7,5 nm bis 20 nm a) vor und b) nach Zugabe von $5 \cdot 10^{-6}$ M CV. ....	58
Abbildung 4-6: Extinktionsspektren von monodispersen, Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln mit einem Radius von 7,5 nm bis 20 nm nach Zugabe von a) $10^{-4}$ M PATP und b) $10^{-5}$ M Adenin. ....	59
Abbildung 4-7: Verstärkungsfaktoren der unterschiedlich großen Goldnanopartikel aus dem SERS-Experiment (schwarze Quadrate) und elektromagnetische Verstärkung ermittelt aus den UV/Vis-Spektren nach Gleichung 33 (rote Kreise) in Abhängigkeit von der Nanopartikelgröße. Die Bestimmung der Verstärkungsfaktoren erfolgte mit $5 \cdot 10^{-6}$ M CV ( $\lambda = 633$ nm, Intensität: $2,7 \cdot 10^4$ W·cm <sup>-2</sup> , 1 s) Die Verstärkungsfaktoren, die aus den UV/Vis-Daten ermittelt wurden, wurden skaliert um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen. ....	60
Abbildung 4-8: Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Konzentration an Kristallviolett für Goldnanopartikel mit einem Radius von a) 7,5 nm, b) 15 nm und c) 20 nm ermittelt aus dem SERS-Experiment ( $\lambda = 633$ nm, Intensität: $2,7 \cdot 10^4$ W·cm <sup>-2</sup> , 1 s)	

(schwarze Quadrate) und empirisch aus den UV/Vis-Spektren nach Gleichung 33 (rote Kreise). Die Verstärkungsfaktoren, die aus den UV/Vis-Daten ermittelt wurden, wurden skaliert, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen. ....	63
Abbildung 4-9: UV/Vis-Spektren von Goldnanopartikeln mit 7,5 nm, 15 nm und 20 nm Radius nach Zugabe von CV in unterschiedlichen Konzentrationen .....	64
Abbildung 5-1: Schematische Darstellung des Linkermoleküls.....	67
Abbildung 5-2: Extinktionsspektren von Citrat-stabilisierten Goldnanopartikel (Ref. <sup>[24]</sup> ), die mit unterschiedlichen Organosilanen immobilisiert wurden (APTMS: 3-Aminopropyltrimethoxysilan, MPTMS: 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan, PTMS: Propyltrimethoxysilan). ....	68
Abbildung 5-3: UV/Vis-Spektren von immobilisierten Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln (Ref. <sup>[114]</sup> , APTMS) bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen während der Immobilisierung (Inkubationszeit im Silan, Trocknung nach Silanisierung). ....	69
Abbildung 5-4: Extinktionsspektren von a) Citrat-reduzierten Silbernanopartikeln, b) Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln, c) laserablatierten Silbernanopartikeln und d) Citrat-reduzierten Goldnanopartikel immobilisiert mit unterschiedlichen Linkern (APTES: 3-Aminopropyltriethoxysilan, APTMS: 3-Aminopropyltrimethoxysilan). ....	70
Abbildung 5-5: SFM-Aufnahmen (5x5 µm <sup>2</sup> ) von immobilisierten a, b) Citrat-reduzierten Silbernanopartikeln, c) Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln, d) laserablatierten Silbernanopartikeln und e) Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln. Die Partikel in a und c-e wurden mit APTES immobilisiert und die Partikel in b mit APTES.....	72
Abbildung 5-6: Schematische Verteilung des Verstärkungsfaktors in Abhängigkeit von der Position (x, y) auf Oberflächen mit a) Citrat-reduzierten Silbernanopartikeln, b) Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln, c) laserablatierten Silbernanopartikeln und d) Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln, die mit APTMS (linke Spalte) bzw. APTES (rechte Spalte) immobilisiert wurden. Die Verstärkungsfaktoren wurden mit 5·10 <sup>-6</sup> M CV als Analyt bestimmt. Die SERS-Spektren wurden in einem Abstand von 10 µm	

aufgenommen ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ , Intensität:  $2,7 \cdot 10^3 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 1 s) und der Durchmesser der Messpunkte betrug  $1,5 \text{ }\mu\text{m}$  (nicht skaliert in der Darstellung). ..... 76

Abbildung 5-7: SFM-Aufnahmen ( $1 \times 1 \text{ }\mu\text{m}^2$ ) von a) Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln, b) laserablatierten Silbernanopartikeln und c) Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln, die mit APTES immobilisiert wurden. .... 77

Abbildung 5-8: a) Schematische Verteilung des Verstärkungsfaktors in Abhängigkeit der Position (x,y) auf Q-SERS GP1 (Nanovra Inc.) und b) SFM-Aufnahme eines Ausschnitts der Oberfläche von Q-SERS GP1(Nanovra Inc.). Die Verstärkungsfaktoren wurden mit  $5 \cdot 10^{-6} \text{ M CV}$  als Analyt bestimmt. Die SERS-Spektren wurden in einem Abstand von  $10 \text{ }\mu\text{m}$  aufgenommen ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ , Intensität:  $6,7 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 1 s) und der Durchmesser der Messpunkte betrug  $1,5 \text{ }\mu\text{m}$  (nicht skaliert in der Darstellung). ..... 78

Abbildung 5-9: Extinktionsspektren von Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln mit einem Radius von 7 nm und 15 nm, die mit APTES auf Glasoberflächen immobilisiert wurden. .... 79

Abbildung 5-10: SFM-Aufnahmen von immobilisierten, monodispersen, Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln mit einem Radius von a) 7 nm und b) 15 nm (Linker: APTES) ..... 80

Abbildung 5-11: Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Kristallviolett-konzentration auf immobilisierten monodispersen, Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln mit einem Radius von a) 7 nm und b) 15 nm. .... 81

Abbildung 5-12: Extinktionsspektren von gemischten Gold-Silber-Substraten, die mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Gold- und Silbernanopartikeln in der Nanopartikel-lösung hergestellt wurden. (Au (c): Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel, Ag (c): Citrat-stabilisierte Silbernanopartikel, Ag (h): Hydroxylamin-reduzierte Silbernanopartikel, Linker: APTES) ..... 82

Abbildung 5-13: REM-Aufnahmen gemischter Gold-Silber-Substrate: a) Au(c):Ag(h)  $\sim 3$ , b) Au(c):Ag(h)  $\sim 0,3$ , c) Au(c):Ag(c)  $\sim 10$  (Verhältnis von Gold zu Silbernanopartikeln in den Nanopartikel-lösungen). (Au (c): Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel, Ag (c): Citrat-stabilisierte Silbernanopartikel, Ag (h): Hydroxylamin-reduzierte Silbernanopartikel,



Linker: APTES). Zur Verbesserung der Leitfähigkeit der Proben wurden diese mit Kohlenstoff bedampft. d) EDX-Spektren von Punktanalysen zweier verschiedener Partikel auf einem gemischten Gold-Silber-Substrat.....83

Abbildung 5-14: Schematische Verteilung des Verstärkungsfaktors in Abhängigkeit der Position (x,y) auf gemischten Gold-Silbersubstraten bestehend aus Citrat-reduzierten Gold- und Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln mit einem Mischungsverhältnis von a) Au:Ag ~ 3, b) Au:Ag ~ 1, Au:Ag ~ 0.3 in der Inkubationslösung. Die Verstärkungsfaktoren wurden mit  $5 \cdot 10^{-6}$  M Kristallviolett als Analyt bestimmt. Die SERS-Spektren wurden in einem Abstand von 10  $\mu\text{m}$  aufgenommen ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ , Intensität:  $2,7 \cdot 10^3 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 1 s) und der Durchmesser der Messpunkte betrug 1,5  $\mu\text{m}$  (nicht skaliert in der Darstellung). .....85

Abbildung 5-15: Vereinfachte Schematische Darstellung der Struktur gemischter Gold-Silber-Nanopartikeloberflächen hergestellt mit PATP.....86

Abbildung 5-16: a) Extinktionsspektren von Goldnanopartikelsubstraten, die mit PATP funktionalisiert und anschließend in einer Lösung mit Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. b) SFM-Aufnahme eines Ausschnitts ( $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ) des Substrats aus a) mit  $10^{-5}$  M PATP (blaues Spektrum). .....86

Abbildung 6-1: a) REM-Aufnahme eines elektronenstrahlolithographisch hergestellten Substrats mit Goldzylindern (Höhe: 40 nm, Abstand: 70 nm) auf einem Siliziumwafer und b) Schematische Verteilung des Verstärkungsfaktors in Abhängigkeit der Position (x, y). Die Verstärkungsfaktoren wurden mit  $1 \cdot 10^{-5}$  M Kristallviolett als Analyt bestimmt. Die SERS-Spektren wurden in einem Abstand von 10  $\mu\text{m}$  aufgenommen ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ , Intensität:  $2,7 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 1 s) und der Durchmesser der Messpunkte betrug 1,5  $\mu\text{m}$  (nicht skaliert in der Darstellung). .....89

Abbildung 6-2: a) REM-Aufnahme eines elektronenstrahlolithographisch hergestellten Substrats mit Goldzylindern (Höhe: 40 nm, Abstand: 70 nm) auf einem Siliziumwafer mit  $\text{SiO}_2$ -Schicht (100 nm) und b) Schematische Verteilung des Verstärkungsfaktors in Abhängigkeit der Position (x, y). Die Verstärkungsfaktoren wurden mit  $1 \cdot 10^{-5}$  M Kristallviolett als Analyt bestimmt. Die SERS-Spektren wurden in einem Abstand von

10  $\mu\text{m}$  aufgenommen ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ , Intensität:  $2,7 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 1 s) und der Durchmesser der Messpunkte betrug 1,5  $\mu\text{m}$  (nicht skaliert in der Darstellung). .....91

Abbildung 6-3: Verteilung der elektrischen Feldintensität von Goldzylinderdimeren (Höhe: 50 nm, Abstand: 70 nm) auf a) einer Siliziumschicht (100 nm) und b) einer Siliziumdioxidschicht (100 nm). Die Verteilung der Feldintensität wurde über FDTD-Berechnungen bestimmt. Es wurde eine Intensität des Anregungsfeldes von 1 gewählt, sodass das erhaltene Feld der Feldverstärkung durch die Nanostrukturen entspricht. Wie in Gleichung 1 entspricht die Verstärkung im SERS-Experiment ungefähr dem Quadrat der Feldintensität, da sowohl das Anregungsfeld, als auch das gestreute Feld verstärkt werden, wenn die Frequenz der Felder in Resonanz zur Plasmonenresonanz steht (siehe Kapitel 1). .....91

Abbildung 6-4: REM-Aufnahmen einer elektronenstrahlolithographisch hergestellten Oberfläche mit Goldzylindern (Bereich B, Höhe und Durchmesser der Primärpartikel: 40 nm), die mit 36 nm zusätzlichem Gold bedampft wurde. In b) ist ein Ausschnitt der Aufnahme in a) dargestellt. Der Ausschnitt stammt aus dem vorstrukturierten Bereich, der in a) mit B markiert ist. ....92

Abbildung 6-5: Schematische Verteilung des Verstärkungsfaktors in Abhängigkeit der Position (x, y) auf einem mittels Elektronenstrahlolithographie hergestellten Goldsubstrat, das zusätzlich mit Gold bedampft wurde (Abbildung 6-4) a) im Bereich der Goldzylinder (Fläche B in Abbildung 6-4 a) und b) außerhalb des vorstrukturierten Bereichs (Fläche A in Abbildung 6-4 a). Die Verstärkungsfaktoren wurden mit  $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  Kristallviolett als Analyt ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ , Intensität:  $2,7 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 1 s) bestimmt. Die SERS-Spektren wurden in einem Abstand von 10  $\mu\text{m}$  aufgenommen und der Durchmesser Messpunkte betrug 1,5  $\mu\text{m}$  (nicht skaliert in der Darstellung). ....93

Abbildung 6-6: Verteilung der elektrischen Feldintensität von Goldzylinderdimeren mit unterschiedlichen Höhen h, Durchmessern d und Abständen a auf einer Siliziumdioxidschicht (100 nm): a) h = 50 nm, d = 50 nm, a = 70 nm, b) h = 50 nm, d = 50 nm, a = 5 nm, c) h = 50 nm, d = 50 nm, a = 2 nm, d) h = 80 nm, d = 80 nm, a = 2 nm. Die Verteilung der Feldintensität wurde über FDTD-Berechnungen bestimmt. Es wurde eine Intensität des Anregungsfeldes von 1 gewählt, sodass das erhaltene Feld der Feldverstärkung durch die Nanostrukturen entspricht. Wie in Gleichung 1 entspricht

die Verstärkung im SERS-Experiment ungefähr dem Quadrat der Feldintensität, da sowohl das Anregungsfeld, als auch das gestreute Feld verstärkt werden, wenn die Frequenz der Felder in Resonanz zur Plasmonenresonanz steht (siehe Kapitel 1).....94

Abbildung 6-7: Verteilung der Feldintensität in Nanopartikelarrays mit a) Zylinder mit einer Höhe von 50 nm und b) Zylindern mit einer Höhe von 50 nm, in deren Zwischenräumen sich 20 nm große Goldnanopartikel befinden. Die Verteilung der Feldintensität wurde über FDTD-Berechnungen bestimmt. Es wurde eine Intensität des Anregungsfeldes von 1 gewählt, sodass das erhaltene Feld der Feldverstärkung durch die Nanostrukturen entspricht. Wie in Gleichung 1 entspricht die Verstärkung im SERS-Experiment ungefähr dem Quadrat der Feldintensität, da sowohl das Anregungsfeld, als auch das gestreute Feld verstärkt werden, wenn die Frequenz der Felder in Resonanz zur Plasmonenresonanz steht (siehe Kapitel 1).....96

Abbildung 7-1: Schematische Darstellung der Reduktion von *p*-Nitrothiophenol zu *p*-Aminothiophenol mit Natriumborhydrid.....99

Abbildung 7-2: a) Schematische Verteilung des Verstärkungsfaktors in Abhängigkeit von der Position (x, y) und b) REM-Aufnahme eines Substrats mit simultan immobilisierten, Citrat-stabilisierten Gold- und Platinnanopartikeln. Die Verstärkungsfaktoren wurden mit  $5 \cdot 10^{-6}$  M Kristallviolett als Analyt ( $\lambda = 633$  nm, Intensität:  $8,5 \cdot 10^3$  W·cm<sup>-2</sup>, 1 s) bestimmt. Die SERS-Spektren wurden in einem Abstand von 10 µm aufgenommen und der Durchmesser der Messpunkte betrug 1,5 µm (nicht skaliert in der Darstellung). ..... 100

Abbildung 7-3: STM-Aufnahmen von Citrat-stabilisierten Gold- und Platinnanopartikeln auf HOPG-Substraten auf Flächen von 80x80 nm<sup>2</sup> bzw. 60x60 nm<sup>2</sup>. ..... 101

Abbildung 7-4: SERS-Spektren von PNTP und PATP (jeweils  $10^{-4}$  M) auf a) Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln und b) Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikeln, die jeweils mit APTES immobilisiert wurden ( $\lambda = 785$  nm,  $I = 4,8 \cdot 10^4$  W·cm<sup>-2</sup>, 1 s). .... 102

Abbildung 7-5: Strukturformeln und SERS-Spektren von a)  $10^{-4}$  M Nilblau, b)  $10^{-4}$  M Acridin Orange, c)  $10^{-4}$  M 2-NaphtalenthioI auf immobilisierten, Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln (Linker: APTES) ( $\lambda = 785$  nm,  $I = 4,8 \cdot 10^4$  W·cm<sup>-2</sup>, 1 s)..... 104

Abbildung 7-6: Vergleich der SERS-Spektren von PNTP, PATP und 2-NT (jeweils $10^{-4}$ M) auf immobilisierten Goldnanopartikeln (Linker: APTES) ( $\lambda = 785$ nm, $I = 4,8 \cdot 10^4$ W·cm $^{-2}$ , 1 s). Die mit Stern markierten Banden werden später für die relative Quantifizierung verwendet (siehe Abschnitt 7.3).....	104
Abbildung 7-7: Extinktionsspektren von a) $10^{-4}$ M Nilblau, b) $10^{-5}$ M Acridin Orange und c) $10^{-4}$ M 2-Naphtalenthioi vor und nach Zugabe von Natriumborhydrid und Katalysator (Platinnanopartikel).....	105
Abbildung 7-8: SERS-Spektren von PNTP und 2-NT (jeweils $10^{-4}$ M) auf einer gemischten Oberfläche mit Gold-und Platinnanopartikeln nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Zugabe von Natriumborhydrid ( $\lambda = 785$ nm, $I = 4,8 \cdot 10^4$ W·cm $^{-2}$ , 1 s).....	107
Abbildung 7-9: Pseudo-erster Ordnung-Auftragung des Intensitätsverhältnisses der Banden von PNTP und 2-NT bei 724cm $^{-1}$ und 599 cm $^{-1}$ in Abhängigkeit der Zeit für a) ein gemischtes Gold-Platin-Substrat (Linker: APTES) und b) ein Goldsubstrat (Citrat, Linker: APTES), bei dem Pt-Nanopartikel in Lösung als Katalysator verwendet wurden. ....	108
Abbildung 7-10: Pseudo-erster Ordnung-Auftragung des Intensitätsverhältnisses von PNTP und 2-NT bei 724 cm $^{-1}$ und 599 cm $^{-1}$ in Abhängigkeit der Zeit für Goldsubstrate (Citrat, Linker: APTES) mit a) Ni(acac) $_2$ und b) Cu(acac) $_2$ als Katalysator.....	109
Abbildung 7-11: Zeitlicher Verlauf der Extinktionsspektren nach Zugabe von Natriumborhydridlösung und Platinnanopartikeln zu einer PNTP-Lösung.....	110
Abbildung 7-12: Pseudo-erster Ordnung-Auftragung der Extinktion der Bande von PNTP. ....	110
Abbildung 8-1: SERS-Spektren der wasserlöslichen Bestandteile von Pollenkörnern vier verschiedener Pflanzenarten, die a) mit Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln in Lösung und b) mit immobilisierten, Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln (Linker: APTES), erhalten wurden. Bei den Spektren handelt es sich um Mittelwertspektren von jeweils 100 Spektren einer Probe. ....	114
Abbildung 8-2: Relative Standardabweichung, ermittelt aus jeweils 100 SERS-Spektren einer Probe der wasserlöslichen Bestandteile von Pollen vier verschiedener Pflanzenarten	

für Messungen mit a) Goldnanopartikeln in Lösung und b) immobilisierten Goldnanopartikeln.....	115
Abbildung 8-3: Ergebnisse der Clusteranalysen mit SERS-Spektren der wasserlöslichen Bestandteile von Pollenkörnern verschiedener Pflanzenarten, die mit a) Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln in Lösung und b) mit immobilisierten Citrat-reduzierten Goldnanopartikeln (Linker: APTES) aufgenommen wurden, dargestellt als Dendrogramm. Die Gruppierung der Spektren erfolgte anhand ihrer euklidischen Abstände mit Hilfe des Single-Linkage-Algorithmus. ....	118
Abbildung 8-4: Mathematische Darstellung der Hauptkomponentenanalyse. Die Datenmatrix X, die die Spektren enthält, wird in eine Scoresmatrix und eine Hauptkomponentenmatrix zerlegt. Die Residuenmatrix enthält die Varianz, die nicht durch die Hauptkomponenten beschrieben wird. N = Anzahl an Proben, M = Anzahl an Variablen (Pixel im Spektrum), Y = Anzahl Faktoren. ....	119
Abbildung 8-5: Auftragung der Scoreswerte, die aus der Hauptkomponentenanalyse von SERS-Spektren der wasserlöslichen Bestandteile von Pollenkörnern verschiedener Pflanzenarten erhalten wurden. a) Scoreswerte der 1. und 2. und b) der 2. und 3. Hauptkomponente. ....	120
Abbildung 8-6: Loadings der Hauptkomponenten 1-3, die die aus der Hauptkomponentenanalyse von SERS-Spektren der wasserlöslichen Bestandteile von Pollenkörnern verschiedener Pflanzenarten erhalten wurden. ....	120
Abbildung 8-7: SERS-Spektren von $10^{-3}$ M Norepinephrinlösung auf einem Hydroxylamin-reduzierten immobilisierten Silbernanopartikeln (Linker: APTES) ( $\lambda = 785$ nm, $I = 4,8 \cdot 10^4$ W·cm $^{-2}$ , 1 s). ....	122
Abbildung 8-8: Schematische Darstellung der Funktionalisierung der Nanopartikel mit Cysteamin und Glutaraldehyd und Anbindung des Norepinephrins. ....	123
Abbildung 8-9: Mögliche Konformationen des Cysteamin, wenn es auf Metalloberflächen gebunden ist (hier als Beispiel eine Silberoberfläche). ....	124
Abbildung 8-10: SERS-Spektren von Hydroxylamin-reduzierten, immobilisierten Silbernanopartikeln (Linker: APTES)Silbersubstraten, die mit a) 5 mM Cysteaminlösung	

und b) 20 mM Cysteaminlösung funktionalisiert wurden ( $\lambda = 785 \text{ nm}$ ,  $I = 4,8 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 10 s)..... 125

Abbildung 8-11: Extinktionsspektren von Hydroxylamin-reduzierten, immobilisierten Silbernanopartikeln (Linker: APTES) vor und nach der Funktionalisierung mit Cysteamin und Glutaraldehyd..... 125

Abbildung 8-12: a) Raman-Spektrum von 3 %-igem Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 8,2) ( $\lambda = 785 \text{ nm}$ ,  $I = 4,8 \cdot 10^5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $10 \times 10 \text{ s}$ ), b, c) SERS-Spektren von auf einem Hydroxylamin-reduzierten immobilisierten Silbernanopartikeln (Linker: APTES), die mit 3 %-iger Glutaraldehydlösung funktionalisiert wurden, b) vor und c) nach Umsetzung mit  $10^{-5} \text{ M}$  Norepinephrin für 1 h ( $\lambda = 785 \text{ nm}$ ,  $I = 4,8 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 1 s)..... 126

Abbildung 8-13: Schematische Darstellung des Abbau von 6-MP durch Methylierung mit Hilfe des Enzyms Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT). ..... 128

Abbildung 8-14: SERS-Spektren von 6-MP- und 6-MMP-Lösung (jeweils  $10^{-5} \text{ M}$ ) auf a) Citrat-reduzierten Gold- und b) Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikelsubstraten (Immobilisierung mit APTES) ( $\lambda = 785 \text{ nm}$ ,  $I = 4,8 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 1 s)..... 129

Abbildung 8-15: Intensitätsverhältnis der Banden bei  $434 \text{ cm}^{-1}$  und  $546 \text{ cm}^{-1}$  im SERS-Spektrum unterschiedlicher Mischungen von 6-MP und 6-MMP in Abhängigkeit des Anteils von 6-MMP ( $R^2$ : 0,97) auf drei identisch hergestellten Silbernanopartikelsubstraten (Hydroxylamin, Linker: APTES). Für jeden Messpunkt wurden 100 Spektren gemittelt und die Standardabweichung bestimmt..... 130

Abbildung 8-16: a) Totalionenstromchromatogramm einer Probe von  $10^{-5} \text{ M}$  6-MP, die für 24 h mit TPMT und S-Adenosyl-L-methionin umgesetzt wurde, b) extrahiertes Ionenstromchromatogramm für  $10^{-5} \text{ M}$  6-MP (m/z 153,1), c) extrahiertes Ionenstromchromatogramm für  $10^{-5} \text{ M}$  6-MMP (m/z 167,1). ..... 132

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Mischungsverhältnisse (Volumina der jeweiligen Nanopartikellösungen und Partikelanzahl) für die Herstellung gemischter Gold-Silber-Nanopartikeloberflächen. Abkürzungen: Au(c): Citrat-reduzierte Goldnanopartikel, Ag(c): Citrat-reduzierte Silbernanopartikel, Ag(h): Hydroxylamin-reduzierte Silbernanopartikel. ....	37
Tabelle 3-2: Verdünnung der Nanopartikellösungen in den Extinktionsmessungen. Probenbezeichnungen: AuNPX, Gold-Nanopartikel, AgNPX, Silbernanopartikel. ....	39
Tabelle 4-1: Extinktionsmaxima, Durchmesser, Partikelkonzentration und Verstärkungsfaktor verschiedener Gold- und Silbernanopartikel. Die Partikeldurchmesser d wurden aus TEM-Aufnahmen ermittelt. Die Partikelkonzentrationen wurden, wie in Abschnitt 3.5 erläutert, bestimmt. Die Bestimmung der Verstärkungsfaktoren (EF) erfolgte mit CV und für einige Nanopartikel auch mit Adenin/Methanol (Werte in Klammern). ....	51
Tabelle 4-2: Extinktionsmaxima $\lambda_{\max}$ , Partikelkonzentrationen und Bedeckungsgrad der Partikel mit Analyt bei Zugabe von $5 \cdot 10^{-6}$ M CV, $5 \cdot 10^{-5}$ M Adenin und $10^{-4}$ M PATP für monodisperse Citrat-reduzierte Goldnanopartikel mit einem Radius von 7,5 nm bis 20 nm. Die Partikelkonzentrationen und der Bedeckungsgrad wurden wie in Abschnitt 3.1 und 3.7 erläutert, bestimmt. ....	59
Tabelle 4-3: Verstärkungsfaktoren der Goldnanopartikel mit unterschiedlichen Partikelradien aus dem SERS-Experiment. ....	61
Tabelle 5-1: Statistische Daten, die aus den SFM-Bildern in Abbildung 5-5 ermittelt wurden, sowie der durchschnittliche Verstärkungsfaktor der Substrate. Die unterschiedlichen Werte für die Citrat-reduzierten Silbernanopartikel, die mit APTMS immobilisiert wurden, wurden aus zwei Aufnahmen von unterschiedlichen Bereichen auf dem Substrat ermittelt. Für alle anderen Nanopartikel sind die Werte für unterschiedliche Bereiche sehr ähnlich. Ag (C): Citrat-stabilisierte Silbernanopartikel, Ag (H): Hydroxylamin-reduzierte Silbernanopartikel, Ag (LA): laserablatierte Silbernanopartikel, Au (C): Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel, APTMS: 3-Aminopropyltrimethoxysilan, APTES: 3-Aminopropyltriethoxysilan. ....	73

Tabelle 5-2: Statistische Daten ermittelt aus den SFM-Aufnahmen in Abbildung 5-10. ..80

Tabelle 6-1: Verstärkungsfaktoren für vier elektronstrahlolithographisch hergestellte Goldpartikelarrays mit einer Höhe der Primärpartikel  $h$ , auf die zusätzliches Gold der Schichtdicke  $s$  aufgedampft wurde: a)  $h = 20$  nm,  $s = 20$  nm, b)  $h = 27$  nm,  $s = 40$  nm, c)  $h = 30$  nm,  $s = 24$  nm, d)  $h = 40$  nm,  $s = 24$  nm. Die Substrate waren in Bereiche mit unterschiedlichem Durchmesser  $d$  und variierendem Abstand zwischen den Nanostrukturen  $\Lambda$  in nm unterteilt. Die Verstärkungsfaktoren wurden mit  $1 \cdot 10^{-6}$  M Kristallviolett als Analytmolekül bestimmt ( $\lambda = 633$  nm,  $I = 1,2 \cdot 10^5$  W·cm<sup>-2</sup>, 1 s). .....96

Tabelle 7-1: Geschwindigkeitskonstanten für drei verschiedene Katalysatoren, ermittelt mit SERS und UV/Vis, und die Bestimmtheitsmaße der jeweiligen Fitfunktionen. .... 111